

## 博士論文

1. 年度：2017 年度（平成 29 年度）
2. 題目：作付け前診断のための土壌残留ヘプタクロル類の免疫学的測定法の構築と Lab-on-a-CD への応用に関する研究
3. 研究科名：兵庫県立大学大学院工学研究科
4. 所属コース名：機械系工学専攻
5. 氏名：片岡 千和
6. 提出日：2018 年（平成 30 年）3 月 16 日
7. 指導教官名・職位：内海 裕一 教授

作付け前診断のための土壌残留ヘプタクロル類の免疫学的  
測定法の構築と **Lab-on-a-CD** への応用に関する研究

2018 年 3 月

兵庫県立大学大学院工学研究科  
機械系工学専攻

片岡 千和

## 目次

第1章 序論	1
1-1. 本研究の背景（土壌残留ディルドリン、ヘプタクロル類の問題点）	1
1-2. 本研究の目的	3
1-3. 本論文の構成	3
第2章 ヘプタクロル類、ディルドリンを認識する新規なモノクローナル抗体 の作製と間接競合 ELISA（indirect competitive enzyme linked immuno- sorbent assay : ic-ELISA）の構築	5
2-1. はじめに	5
2-2. 材料および方法	7
2-2-1. ハプテン分子の設計と合成	8
2-2-2. マウスの免疫	16
2-2-3. ハイブリドーマの作製	17
2-2-4. ヘプタクロル類、ディルドリンを認識するモノクローナル抗体 産生株の樹立	17
2-2-5. マウス腹腔培養とモノクローナル抗体の精製	18
2-2-6. 作製したモノクローナル抗体の評価	18
2-3. 結果および考察	19
2-3-1. ハプテンの NMR 分析	19
2-3-2. ヘプタクロル類、ディルドリンを認識するモノクローナル抗体 の評価	20
2-3-2-1. ic-ELISA へのメタノールの影響	22
2-3-2-2. iic-ELISA の構築	23
2-3-2-3. 交差反応性の評価	25
2-3-3. 特異性が異なる 2 種類の抗体を用いた ic-ELISA による混在下 におけるディルドリンおよびヘプタクロル類の測定方法の構築	27
2-3-3-1. モノクローナル抗体の特異性に基づく標準品混合液中のディルドリン およびヘプタクロル類の濃度推定式	27
2-3-3-2. 標準混合液中のディルドリンおよびヘプタクロル類の濃度推定式 の検証	32
2-3-4. ic-ELISA の評価（精度とスパイク試験）	33

第3章 免疫測定法に適した土壌試料前処理法の構築	35
3-1. はじめに	35
3-2. 材料および方法	36
3-2-1. ヘプタクロル類測定のための ic-ELISA の最適化	36
3-2-2. 土壌抽出液の調製	37
3-2-3. グラファイトカーボン担体による土壌抽出液の前処理の検討	37
3-2-3-1. グラファイトカーボン担体による吸脱着効果	37
3-2-3-2. グラファイトカーボン担体を用いた MSPD 法による土壌抽出液の精製	38
3-2-4. グラファイトカーボン／E-HyCu <sup>®</sup> 担体を用いた MSPD 法による 土壌抽出液前処理法の構築	38
3-3. 結果および考察	41
3-3-1. ヘプタクロル類測定のための ic-ELISA の最適化	41
3-3-2. グラファイトカーボン担体による吸脱着効果	44
3-3-3. グラファイトカーボン担体を用いた MSPD 法による精製効果	45
3-3-4. グラファイトカーボン／E-HyCu <sup>®</sup> 担体を用いた MSPD 法による 土壌抽出液の精製	47
3-3-5. MSPD 法により精製した土壌抽出液の評価結果	48
第4章 免疫測定法による土壌残留ヘプタクロル類分析法の開発	50
4-1. はじめに	50
4-2. 材料および方法	50
4-2-1. 圃場より採取した土壌試料の調製	50
4-2-2. 機器分析値（GC-MS）との相関	50
4-3. 結果および考察	51
第5章 Lab-on-a-CD への免疫測定法の応用	53
5-1. はじめに	53
5-2. 3次元 Lab-on-a-CD の構成	55
5-3. 官能基導入基板へのビオチン-ストレプトアビジン累積層 作製の検討	59
5-3-1. 官能基導入基板の概略	59
5-3-2. 塩素基導入基板 P(MMA/CEMA)を利用した抗体集積化の戦略	63

5-3-3. アミノ基導入基板への機能性タンパク質の結合評価	64
5-3-3-1. 実験方法	64
5-3-3-2. 結果および考察	64
5-4. Lab-on-a-CD 上でのマウスイムングロブリン G のサンドイッチ ELISA の構築	66
5-4-1. 実験方法	66
5-4-2. 結果および考察	66
第6章 総括	68
参考文献	71
謝辞	80
研究業績	81

## 第1章 序論

### 1-1. 本研究の背景（土壌残留ディルドリン、ヘプタクロル類の問題点）

ドリ剤（アルドリ、ディルドリン、エンドリン）やヘプタクロルは高度に塩素化されたシクロペンタジエン環構造を有する化合物である。環境中での残留性や生物蓄積性、人や生物への毒性が高く、長距離移動性が懸念される残留性有機汚染物質（persistent organic pollutants ; POPs）に指定されており、ストックホルム条約によりその製造及び使用の廃絶・制限・排出の削減、および、これらの物質を含む廃棄物等の適正処理等が規制されている<sup>1)</sup>。我が国は2002年8月に本条約に加入した<sup>2)</sup>。ドリ剤やヘプタクロルは強力な害虫駆除剤、殺虫剤として世界的に使用されてきたが、その残留性や環境中への蓄積性、および、食物連鎖における生物濃縮のなどの問題から、現在では使用されていない<sup>3),4)</sup>。

我が国においては、ドリ剤およびヘプタクロルは農業分野で多用され、圃場に多量に散布されてきた。アルドリとディルドリンは1954年に農薬登録され、ヘプタクロルは1957年に農薬登録されており、1970年代の中期までに3313トンのアルドリ、683トンのディルドリン、1500トンのヘプタクロルが輸入された。1972年から1975年の間にディルドリンおよびヘプタクロルは農薬登録が失効され、以後30年以上、我が国ではディルドリンおよびヘプタクロルは使用されていない<sup>5)-8)</sup>。しかしながら、ディルドリンおよびヘプタクロルの土壌中での半減期は非常に長く、かつて使用された圃場にこれらの農薬およびその代謝物が長期に渡り残留している<sup>9)-11)</sup>。

土壌中においてアルドリは容易に酸化を受けディルドリンに代謝され<sup>12)</sup>、ヘプタクロルはそのほとんどがヘプタクロル-シス-エポキシド（HEPX）に代謝される<sup>13)</sup>。農地に残留するディルドリン、および、ヘプタクロルとその代謝物であるHEPX（以下、ヘプタクロル類と称す）は、キュウリやカボチャなどの瓜科作物によって土壌より能動的に吸収される。ディルドリンはキュウリ<sup>14)-16)</sup>に、ヘプタクロル類はカボチャ<sup>17)</sup>に選択的に吸収され、作物中に残留基準値を上回る濃度で検出される事例が報告され、近年、社会的、経済的に大きな問題として取り上げられている。このような状況を踏まえ、土壌中に残留するディルドリンやヘプタクロル類による農産物の汚染を防止・低減するための技術開発やリスク管理が求められており、これらの農薬およびその代謝物の簡易な分析技術の確立が急務となっている。

ディルドリンやヘプタクロル類の分析には従来、GC-MS (gas chromatography-mass spectrometry), GC-ECD (GC-electron capture detection), HPLC-UV (high-performance liquid chromatography with UV detection) 等の機器分析法が用いられている<sup>18)-20)</sup>。機器分析法は分析対象物質のクロマトグラムが得られ、分析対象物質を同定することが可能であり、高感度で信頼性の高い分析方法である。しかしながら、これらの分析方法では、設備の整った実験室と高額な分析機器が必要であり、分析機器の操作にも熟練を要する。分析費用が高額化しやすく、また、試料調製が煩雑であり有機溶媒の使用量も多いことから、多検体分析やオン・サイト分析、あるいは広汎なモニタリングなどには適していない<sup>21)-22)</sup>。一方、免疫測定法は多検体分析等に適した方法であり、高額な分析機器を必要しないにもかかわらず、簡便な操作で高精度かつ高感度測定が可能な測定方法である<sup>23)-26)</sup>。

本論文では、土壤中に残留するヘプタクロル類やディルドリンによる農産物汚染、特に、カボチャへのヘプタクロル類の汚染を防止・低減し、安全安心なカボチャ生産を行うために、生産現場で利用可能なカボチャ作付け前の土壤中ヘプタクロル類分析技術として、間接競合酵素免疫測定法 (indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay : ic-ELISA) を利用した実用的な作付け前土壌残留ヘプタクロル類診断法の構築検討を行った。さらに、免疫測定法の一層の普及を目指し、Lab-on-a-CD への免疫測定法の応用についても検討を行った。

分析が必要となるカボチャ作付け前圃場での農薬の使用履歴より、過去に使用された農薬はヘプタクロルであり、一部、ディルドリン混在の可能性があると判明しており、本研究においては HEPX を主としたヘプタクロル類、および、混在の可能性が考えられるディルドリンが分析対象物質となる。

ヘプタクロルは 1972 年に農薬登録が失効したが、その主要代謝産物であるヘプタクロル-シス-エポキシドが一部未分解のヘプタクロルと共に土壤中に長期に残留し、カボチャから残留基準値 ( $0.03 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) を上回る濃度で検出される事例が認められる<sup>17), 27)</sup>。生産現場で利用可能な、カボチャ作付け前の土壤中ヘプタクロル類の迅速簡便な多検体同時測定法の開発は、カボチャにおけるヘプタクロル類の残留基準値超過リスクに対する有効な対策技術となることが期待される。

## 1-2. 本研究の目的

本研究の目的は、生産現場で利用可能な、カボチャ作付け前の土壤中へプタクロル類の迅速簡便な多検体同時測定法の開発を目指し、ic-ELISA を利用した作付け前土壌残留へプタクロル類診断法を構築する事であり、このため、へプタクロル類を測定するために必要となる新規なモノクローナル抗体の作製とこれらを用いた ic-ELISA の確立を行う。分析試料が農地土壌であることから、ic-ELISA に適した迅速簡便な土壌試料調製法（土壌試料前処理法）についても検討を行い、実用的な土壌中へプタクロル類分析方法の構築を行う。さらに、多検体分析や人為的誤差の排除などの免疫測定の一層の簡便化を図り、有用性を高めるため、Lab-on-a-CD への免疫測定法の適用についても合わせて検討を行う。

## 1-3. 本論文の構成

本論文は、安全安心なカボチャ生産を目指し、ic-ELISA を利用した実用的な作付け前土壌残留へプタクロル類診断法の構築検討を行うとともに、さらに、免疫測定法の普及と用途拡大を目指し、Lab-on-a-CD への免疫測定法の応用について検討したものであり、全編は6章から構成される。以下、各章ごとにその内容の梗概を示す。

第1章は序論であり、本研究の背景や、土壌残留へプタクロル類によるかぼちゃ汚染の現状やかぼちゃ生産現場における土壌残留へプタクロル類分析法の課題について述べ、本研究の目的と現行研究の課題を踏まえた目標設定について記述した。

第2章では、土壌中へプタクロル類分析技術のうち、測定法構築に必要な試薬類や材料の作製について記述した。測定法として多検体迅速分析に有用である免疫測定法を用いることから、免疫測定法の重要な構成試薬であるハプテン分子の設計、ハプテン-キャリアタンパク質複合体の合成、マウス *in vivo* 免疫法による抗体誘導とディルドリン、へプタクロル類を認識する新規なモノクローナル抗体産生株の樹立について検討した。

作製したモノクローナル抗体のうち、特異性の異なる2種類のモノクローナル抗体（DrA-04 抗体、DrC-02 抗体）の ic-ELISA 値より、ディルドリンおよびへプタクロル類混在下に各々の農薬の存在量を算出可能な方法の構築についても検討を行った。



第3章は免疫測定法に適した土壌試料前処理法の検討について述べ、グラファイトカーボンと新規ハイブリッド材料である E-HyCu<sup>®</sup> の2種類の担体を利用したマトリクス固相分散 (matrix solid phase dispersion : MSPD) 法による土壌試料前処理法の構築検討について記述した。

第4章は、圃場より採取した土壌試料 60 検体について、MSPD 法による土壌試料前処理法と ic-ELISA (DrC-02 抗体使用) により土壌残留ヘプタクロル類を分析し、機器分析 (GC-MS) による分析値との比較検討した結果について述べた。

なお、本研究で構築した MSPD 法による土壌抽出液前処理法と、ヘプタクロル類測定用 ic-ELISA の組み合わせによる土壌残留ヘプタクロル類分析法は、土壌残留ヘプタクロルのかぼちゃ作付け前土壌診断ガイドライン [www.hro.or.jp/list/agricultural/center/pdf/heptachlor.pdf](http://www.hro.or.jp/list/agricultural/center/pdf/heptachlor.pdf) (地方独立行政法人北海道立総合研究機構中央農業試験場 農業環境部環境保全グループ) として採択されている。

第5章は Lab-on-a-CD への免疫測定法の応用について記述した。人為的誤差の排除や操作性の簡便化、免疫反応場の微小化による反応の高速化や高収率化等が期待される Lab-on-a-CD 上で免疫測定系を構築するため、官能基導入基板の活用とビオチン・ストレプトアビジン結合による累積膜の形成によって、ビオチン標識 1 次抗体の累積膜を形成させ、サンドイッチ ELISA による Lab-on-a-CD 上でのマウスイムノグロブリン G の測定について検討した。

第6章は総括であり、本研究で得られた結果をまとめた。

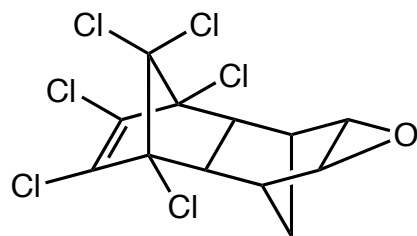
## 第2章 ヘプタクロル類、ディルドリンを認識する新規なモノクローナル抗体の作製と間接競合 ELISA (indirect competitive enzyme linked immunosorbent assay : ic-ELISA) の構築

### 2-1. はじめに

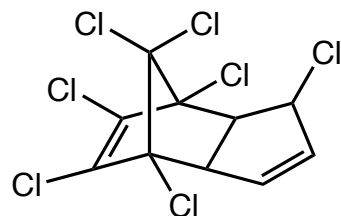
免疫測定法はそれ自体が活性を持たない物質であって、その存在量が極微量のため通常の方法では測定が困難な物質を測定するための方法である。免疫測定法を構築するためには、分析対象物を特異的に認識する抗体を作製する必要があるが、分析対象が多くのマトリクスを含む土壌試料であることから、ポリクローナル抗体に比べより特異性の高いモノクローナル抗体を用いることが望ましい<sup>28)</sup>。1975年に Köhler と Milstein<sup>29)</sup>によってハイブリドーマ作製法が確立され、以後、モノクローナル抗体作製法は、医学、薬学研究のみならず多くの研究分野において重要な技術として発展してきた。

シクロジエン系農薬の免疫測定法についての先行研究として Langone 等<sup>30)</sup>によるディルドリンとアルドリンのラジオイムノアッセイ (radio-immunoassay : RIA) が報告されている。また、Esser 等<sup>31)</sup>によって、アルドリンの誘導体を用いて作製されたシクロジエン系農薬のモノクローナル抗体が報告されている。その他、シクロジエン系農薬の抗体、および、免疫測定法についてはいくつかの先行文献がみられるが、多くは、エンドサルファンおよびその代謝物<sup>32)</sup>,<sup>33)</sup>、あるいは、DDT およびその類縁体 (dichloro-diphenyl-trichloroethan)<sup>34)</sup>,<sup>35)</sup>を測定対象としている。Manclús 等がシクロジエン系農薬の抗体誘導のためのハプテン合成について報告したが、作製されたモノクローナル抗体はシクロジエン系農薬に広範な反応性を有している<sup>36)</sup>。このため、ヘプタクロル類および混在が予想されるディルドリンに対し、より高感度で特異的なモノクローナル抗体の作製を新たに試みた。

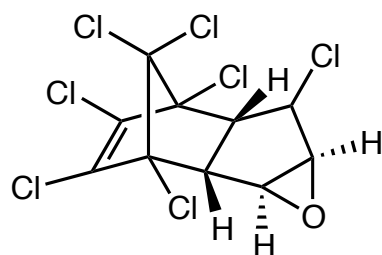
図1に本研究における分析対象となるディルドリン、ヘプタクロル、ヘプタクロル-シス-エポキシド (HEPX) の構造を示した。



(a) ディルドリン



(b) ヘプタクロル



(c) ヘプタクロル-シス-エポキシド (HEPX)

図 1. 分析対象となるシクロジエン系農薬およびその代謝物

## 2-2. 材料および方法

### (1) シクロジエン系農薬および誘導体

ディルドリン, ヘプタクロル, および, HEPX 標準品は Dr. Ehrenstorfer GmbH より購入した. その他のシクロジエン系農薬および代謝物標準品 (ヘプタクロルトランス-エポキシド, アルドリン, エンドリン,  $\alpha$ -エンドサルファン,  $\beta$ -エンドサルファン, エンドサルファン-サルフェイト, シス-クロルデン, トランス-クロルデン) についても, 同じく Dr. Ehrenstorfer GmbH より購入した.

### (2) 溶媒および塩類

分析グレードのメタノール, アセトニトリル, ジメチルスルホキシド (DMSO) の親水性有機溶媒, リン酸, および, 塩化ナトリウム, 塩化カリウム, リン酸二ナトリウム 12 水, リン酸二カリウムの塩類はナカライテスクより購入した. なお, 実験に使用する水は, 全て Milli-Q 水製造装置 (Merck Millipore) で調製した.

### (3) ハプテン-タンパク質-コンジュゲート調製用試薬類

キャリアとなるウシ血清アルブミン (BSA), オボアルブミン (OVA) は SIGMA-ALDRICH より購入した. 免疫原およびコンジュゲートの精製に用いる PD-10 カラムは GE Healthcare 製を使用した.

### (4) 免疫測定用試薬および器具

Tween 20 は BIO-RAD より購入した. 発色基質である TMB Microwell Peroxidase Substrate System (TMB), および, パーオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体 (ヤギ) は Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. より, ブロッキング試薬は DS-Pharma Biomedica より購入, 反応停止液であるリン酸はナカライテスクより購入した. 96 ウエルマイクロタイタープレートは Corning Inc. 製を使用した. また, マイクロタイタープレートの洗浄には Bio Washer-50 (大日本住友製薬) を用い, プレートリーダーは Chro Mate<sup>®</sup> (Awareness Technology Inc.) を使用した.

#### (5) マウスとマウス免疫用試薬

被免疫動物である Balb/c マウス(7週齢, 雌, SPF)は Charles River Laboratories より購入した. 免疫増強用のアジュバンドは Corixa Corp.の Ribi アジュバンドシステムを用いた.

#### (6) 細胞培養用試薬および器具

RPMI 1640 培地 (L-グルタミン, HEPES 含有) および, 抗生物質 (ペニシリン, ストレプトマイシン) はナカライテスクより, ウシ胎児血清 (Fetal bovine serum : FBS) は Equitech-Bio Inc.よりそれぞれ購入した. 細胞融合に用いるポリエチレングリコール (PEG) 1500 は Roche Applied Science より購入, 細胞培養用のディスポーザブル製品は Corning Inc.製を使用した.

#### (7) マウス腹腔培養および抗体精製用試薬

2,6,10,14,-テトラメチルペンタデカン (プリスタン) はナカライテスクより購入した. マウス腹腔培養にて調製したマウス腹水からのモノクローナル抗体の精製には, GE Healthcare の Protein G Sepharose 4FF を用いた.

### 2-2-1. ハプテン分子の設計と合成

Manclús<sup>36)</sup>らが報告しているシクロジエン系農薬の抗体作製において, 抗体誘導のハプテンとしては4種類 (CCD1, CCD2, CCD3, CCD4) 合成されており, そのうちのハプテン CCD1, CCD2 からのみ抗体が誘導されている. 最終的に化合物との反応性から測定系を組めたのは CCD2 から誘導された抗体であり, このハプテン CCD2 は既に Stanker らにより特許<sup>37)</sup>になっている. 従って, これらのことを考慮し権利の侵害がないように, ハプテンの設計を行った.

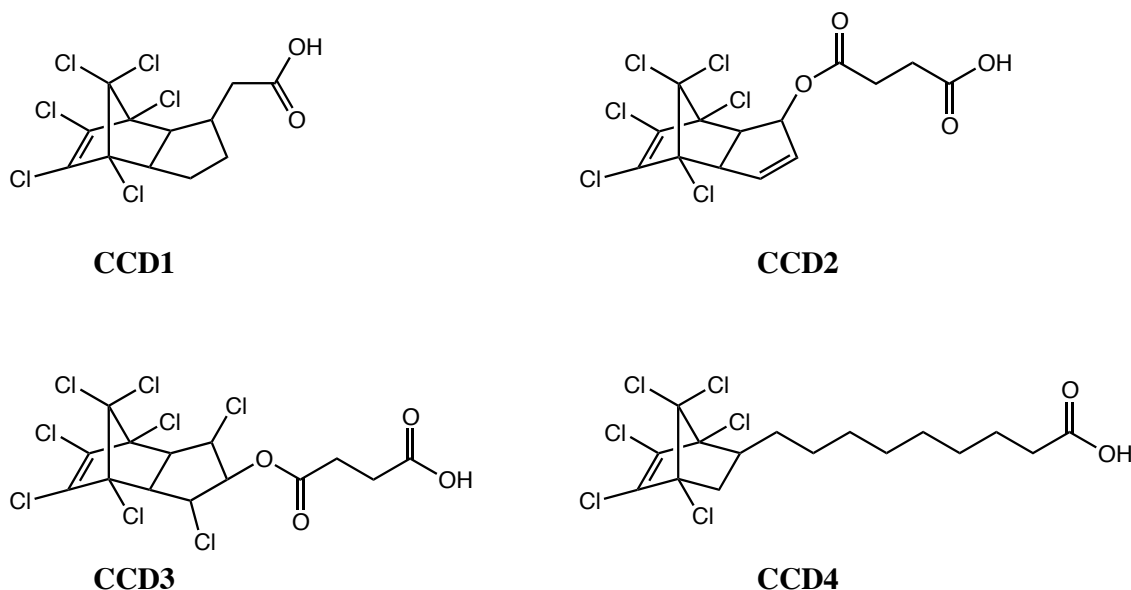


図 2. Manclús<sup>36)</sup>らにより報告されているシクロジエン系農薬用抗体のハプテン

Manclús<sup>36)</sup>らが報告しているハプテン CCD1 は抗体を誘導できていることから、このハプテンを 1 つとして選抜し、DrmA と称した。DrmA とキャリアタンパク質との結合距離が短いことが抗体誘導に不利に働くことが考えられたので、末端のカルボン酸から炭素鎖 4 個分延長したハプテン DrmB を設計した。シクロジエン系農薬の共通骨格であるノルボルネンに炭素鎖 9 のリンカーを導入した CCD4 では抗体を誘導できていないが、これはリンカーが長すぎてキャリアタンパク質表面上に露出するよりも折り込まれて埋もれたためと考えられたので、炭素鎖を短くし、炭素鎖 4 のリンカーが導入された DrmC を設計した。合成ルートを図 3 に示したが、ヘキサクロルシクロペンタジエンと該当するアルケンとのディールス・アルダー反応で行うこととし、アルケンとして 2-シクロペンテン-1-酢酸を用いて DrmA を 5-ヘキセン酸を用いて DrmC を合成することとした。DrmA を  $\beta$ -アラニンエチルエステルと縮合剤により縮合させた後、エステルを加水分解して DrmB に誘導することとした。

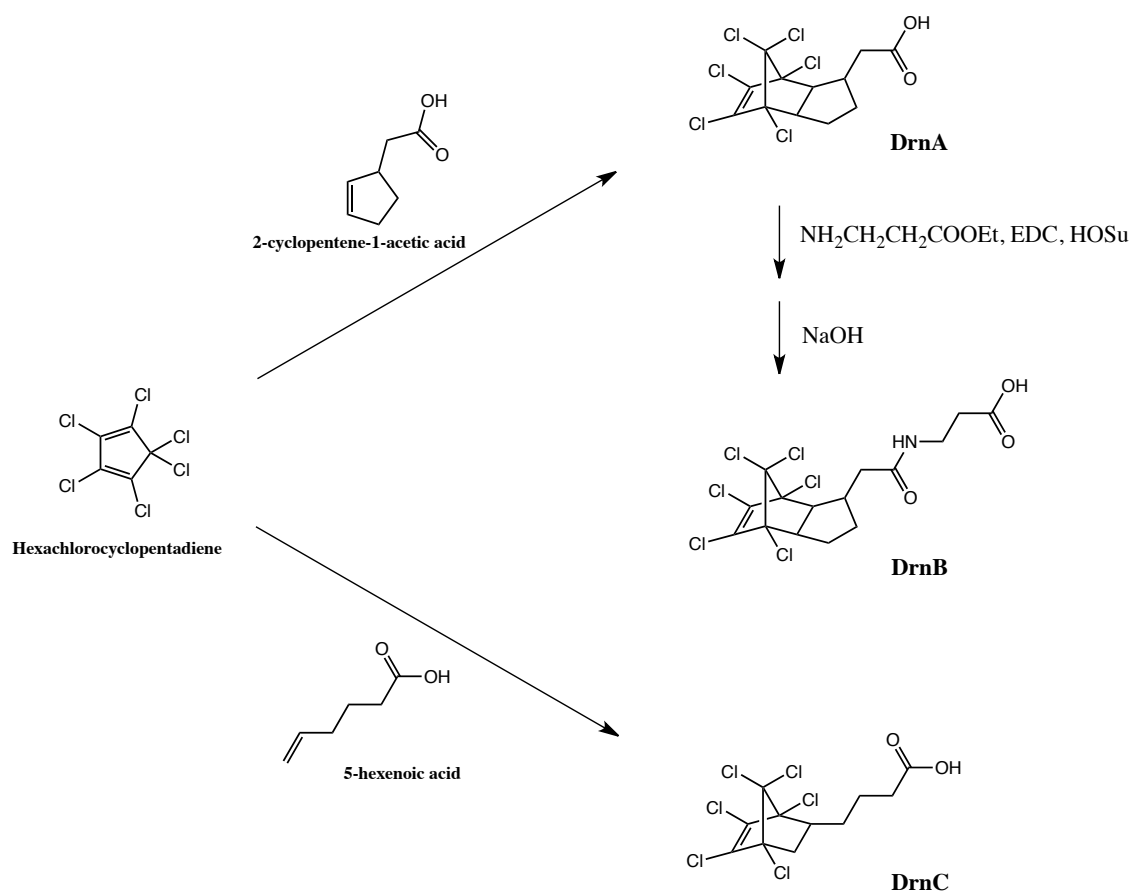


図 3. 3 種類のハプテン (DrnA, DrnB, DrnC) の合成ルート

抗体を誘導する場合、ハプテンをキャリアタンパク質に一定数導入されたコンジュゲートを作製する必要がある、導入数をコントロールすることが抗体誘導の効率を上げる一つの鍵となる。ハプテンの末端のカルボン酸とキャリアタンパク質のアミノ基とのアミド化反応によりコンジュゲートを作製することとしたが<sup>38)</sup>、キャリアタンパク質にもカルボン酸があることから、タンパク分子間での結合を防ぐためにハプテン側のカルボン酸をあらかじめ活性化し、タンパク質溶液中に活性化したハプテンを添加することで、目的の反応だけ進める手法をとることにした。反応は水溶液中で行うため、水による分解が受けにくいN-ヒドロキシスクシンイミド (HOSu) によるカルボン酸の活性エステル体を合成し用いることにした。

ハプテン 3 種類 (DrnA, DrnB, DrnC) およびそれぞれの活性エステル体 (DrnA-OSu, DrnB-OSu, DrnC-OSu) の合成は、所属する合同会社カーバンクル・バイオサイエンテックで行われた。

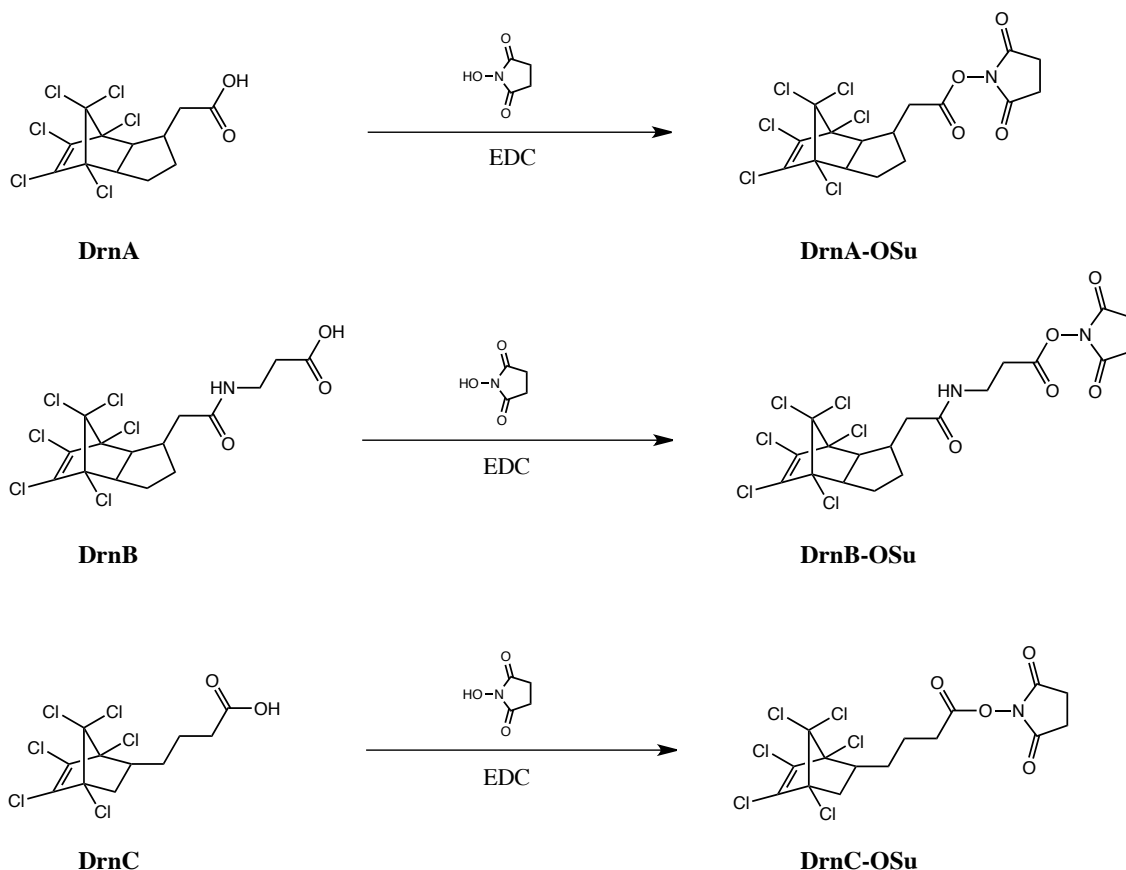


図 4. 3 種類のハプテンの活性エステル体の合成ルート



3 種類のハプテンは水に難溶性の化合物であり、その活性エステル体もまた水に難溶性であるため、キャリアタンパク質とのコンジュゲート化は、キャリアタンパク質の水溶液中に有機溶媒に溶解した活性エステル体を滴下して反応させる方法をとることになる。有機溶媒としては有機化合物が溶解しやすくかつ水に可溶なジメチルスルホキシド (DMSO) を、キャリアタンパク質としては、DMSO 水溶液中でも比較的安定に溶解しているウシ血清アルブミン (BSA) を選択した。BSA (MW 66K) には、活性エステル体と反応するアミノ基はリジン残基側鎖の末端アミノ基 59 個のうち立体構造上 30~35 個存在する。ハプテンとキャリアタンパク質との当量関係は 20 : 1 とし、BSA 15 mg (0.227  $\mu\text{mol}$ ) に対して各活性エステル体 4.54  $\mu\text{mol}$  を反応させた。反応は、50% (v/v) DMSO-水 1.0mL に BSA 溶液 (30 mg/mL, 100 mM リン酸緩衝液 (pH8.0)) 500  $\mu\text{L}$  を加え、攪拌下、活性エステル体の DMSO 溶液 500  $\mu\text{L}$  を滴下し、室温で終夜攪拌させて行った。反応後、反応液をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で平衡化したゲル濾過カラム (PD-10) で精製し、コンジュゲート (DrnA-BSA, DrnB-BSA, DrnC-BSA) それぞれ約 10mgBSA 相当分の画分を分取した。

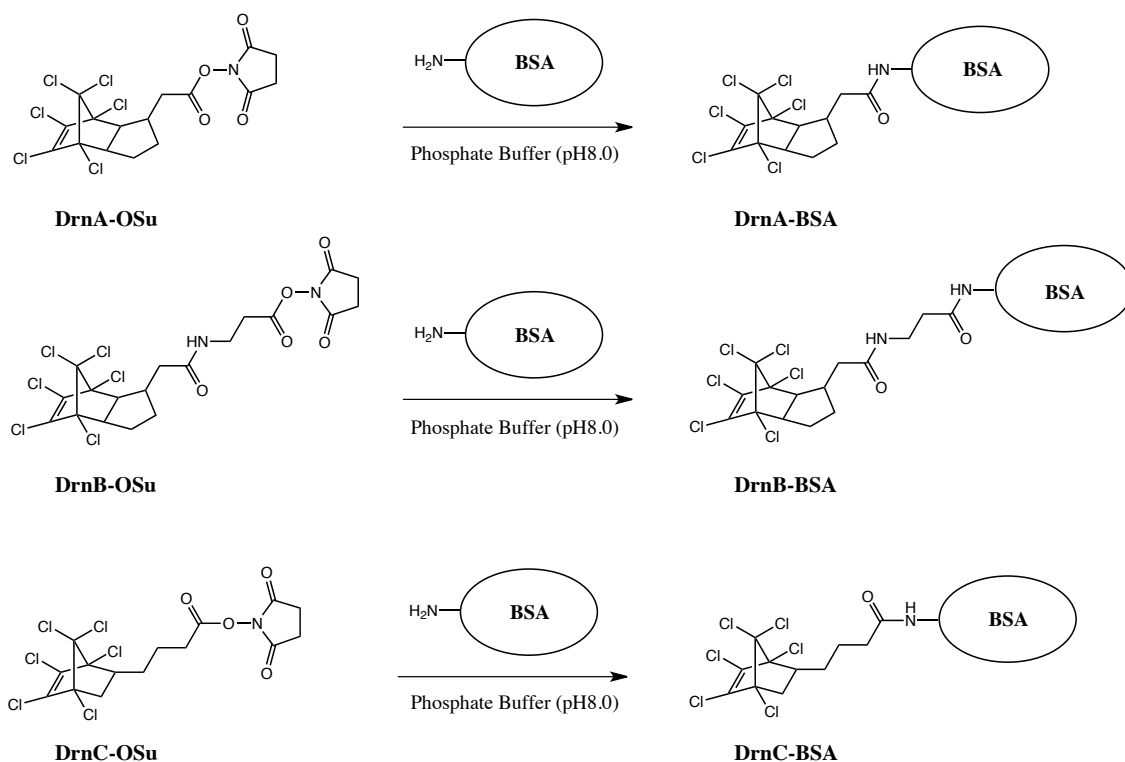


図 5. 3 種類のハプテンの BSA コンジュゲートの調製ルート

ic-ELISA の構築には、抗体が認識し測定対象物質と競合する化合物を測定系の固相に固定化する必要がある。一般的には抗体誘導に用いた免疫原 (DrmA-BSA, DrnB-BSA, DrnC-BSA) を用いるが、測定系の測定感度と抗体の特異性は、この競合する化合物に影響されることから、ハプテンを BSA と異なるタンパクの OVA に結合させ、ハプテンのタンパク上での挙動が抗体誘導時とは異なるようにし、抗体との相互作用に変化が出るようにした。

OVA (MW 45K) には、活性エステル体と反応するアミノ基はリジン残基側鎖の末端アミノ基 20 個が存在する。ハプテンとキャリアタンパク質との当量関係を変化させてハプテンの導入率の異なる OVA コンジュゲートを作製し、競合時の条件に変化を与えることとした。当量関係は 3 種類 (10 : 1, 8 : 1, 5 : 1) とし、OVA 10mg (0.222  $\mu\text{mol}$ ) に対して活性エステル体をそれぞれ 2.22  $\mu\text{mol}$  (10 当量), 1.78  $\mu\text{mol}$  (8 当量), 1.11  $\mu\text{mol}$  (5 当量) を反応させた。反応は、B50%(v/v) DMSO-水 1.0mL に OVA 溶液 (20 mg/mL, 100 mM リン酸緩衝液 (pH8.0)) 500 $\mu\text{L}$  を加え、攪拌下、活性エステル体の DMSO 溶液 500 $\mu\text{L}$  を滴下し、室温で終夜攪拌させて行った。反応後、反応液を PBS で平衡化したゲル濾過カラム (PD-10) で生成し、コンジュゲート (DrmA-OVA, DrnB-OVA, DrnC-OVA) それぞれ約 7mgOVA 相当分の画分を分取した。

#### 免疫原の作製 (BSA コンジュゲートの作製)

BSA 15mg (0.227  $\mu\text{mol}$ ) に対して各活性エステル体 (DrmA-OSu 2.25 mg (4.54  $\mu\text{mol}$ ), DrnB-OSu 2.57 mg (4.54  $\mu\text{mol}$ ), DrnC-OSu 2.20 mg (4.54  $\mu\text{mol}$ )) を反応させた。反応は、50%(v/v) DMSO-水 1.0 mL に BSA 溶液 (30 mg/mL, 100 mM リン酸緩衝液 (pH8.0)) 500  $\mu\text{L}$  を加え、攪拌下、活性エステル体の DMSO 溶液 500  $\mu\text{L}$  を滴下し、室温で終夜攪拌させた。反応後、反応液 2.0mL を PBS で平衡化したゲル濾過カラム (PD-10) に添加し、PBS で展開し、3.5 mL から 5.0 mL に溶出する DMSO および未反応のハプテンを含まないコンジュゲート画分を分取した。コンジュゲート (DrmA-BSA, DrnB-BSA, DrnC-BSA) としてそれぞれ約 10 mg BSA 相当分を得た。

#### OVA コンジュゲート (10 : 1) の作製

OVA 10mg (0.222  $\mu$ mol)に対して各活性エステル体 (DrnA-OSu 1.11 mg (2.22  $\mu$ mol) , DrnB-OSu 1.26 mg (2.22  $\mu$ mol) , DrnC-OSu 1.07 mg (2.22  $\mu$ mol) ) を反応させた。反応は、50% (v/v) DMSO-水 1.0 mL に OVA 溶液 (20 mg/mL, 100 mM リン酸緩衝液 (pH8.0) ) 500  $\mu$ L を加え、攪拌下、活性エステル体の DMSO 溶液(4.44  $\mu$ mol/mL) 500  $\mu$ L を滴下し、室温で終夜攪拌させた。反応後、反応液 2.0mL を PBS で平衡化したゲル濾過カラム (PD-10) に添加し、PBS で展開し、3.5 mL から 5.0 mL に溶出する DMSO および未反応のハプテンを含まないコンジュゲート画分を分取した。コンジュゲート (DrnA (10:1)-OVA, DrnB (10:1)-OVA, DrnC (10:1)-OVA) としてそれぞれ約 7mg OVA 相当分を得た。

#### OVA コンジュゲート (8 : 1) の作製

OVA 10mg (0.222  $\mu$ mol)に対して各活性エステル体 (DrnA-OSu 0.88 mg (1.78  $\mu$ mol) , DrnB-OSu 1.01 mg (1.78  $\mu$ mol) , DrnC-OSu 0.86 mg (1.78  $\mu$ mol) ) を反応させた。反応は、50% (v/v) DMSO-水 1.0 mL に OVA 溶液 (20 mg/mL, 100 mM リン酸緩衝液 (pH8.0) ) 500  $\mu$ L を加え、攪拌下、活性エステル体の DMSO 溶液(3.56  $\mu$ mol/mL) 500  $\mu$ L を滴下し、室温で終夜攪拌させた。反応後、反応液 2.0 mL を PBS で平衡化したゲル濾過カラム (PD-10) に添加し、PBS で展開し、3.5 mL から 5.0 mL に溶出する DMSO および未反応のハプテンを含まないコンジュゲート画分を分取した。コンジュゲート (DrnA (8:1)-OVA, DrnB (8:1)-OVA, DrnC (8:1)-OVA) としてそれぞれ約 7mg OVA 相当分を得た。

#### OVA コンジュゲート (5 : 1) の作製

OVA 10mg (0.222  $\mu$ mol)に対して各活性エステル体 (DrnA-OSu 0.55 mg (1.11  $\mu$ mol) , DrnB-OSu 0.63 mg (1.11  $\mu$ mol) , DrnC-OSu 0.54 mg (1.11  $\mu$ mol) ) を反応させた。反応は、50% (v/v) DMSO-水 1.0 mL に OVA 溶液 (20 mg/mL, 100 mM リン酸緩衝液 (pH8.0) ) 500  $\mu$ L を加え、攪拌下、活性エステル体の DMSO 溶液(2.22  $\mu$ mol/mL) 500  $\mu$ L を滴下し、室温で終夜攪拌させた。反応後、反応液 2.0 mL を PBS で平衡化したゲル濾過カラム (PD-10) に添加し、PBS で展開し、3.5 mL から 5.0 mL に溶出する DMSO および未反応のハプテンを含まないコンジュゲート画分を分取した。コンジュゲート (DrnA (5:1)-OVA, DrnB (5:1)-OVA, DrnC (5:1)-OVA) としてそれぞれ約 7 mgOVA 相当分を得た。

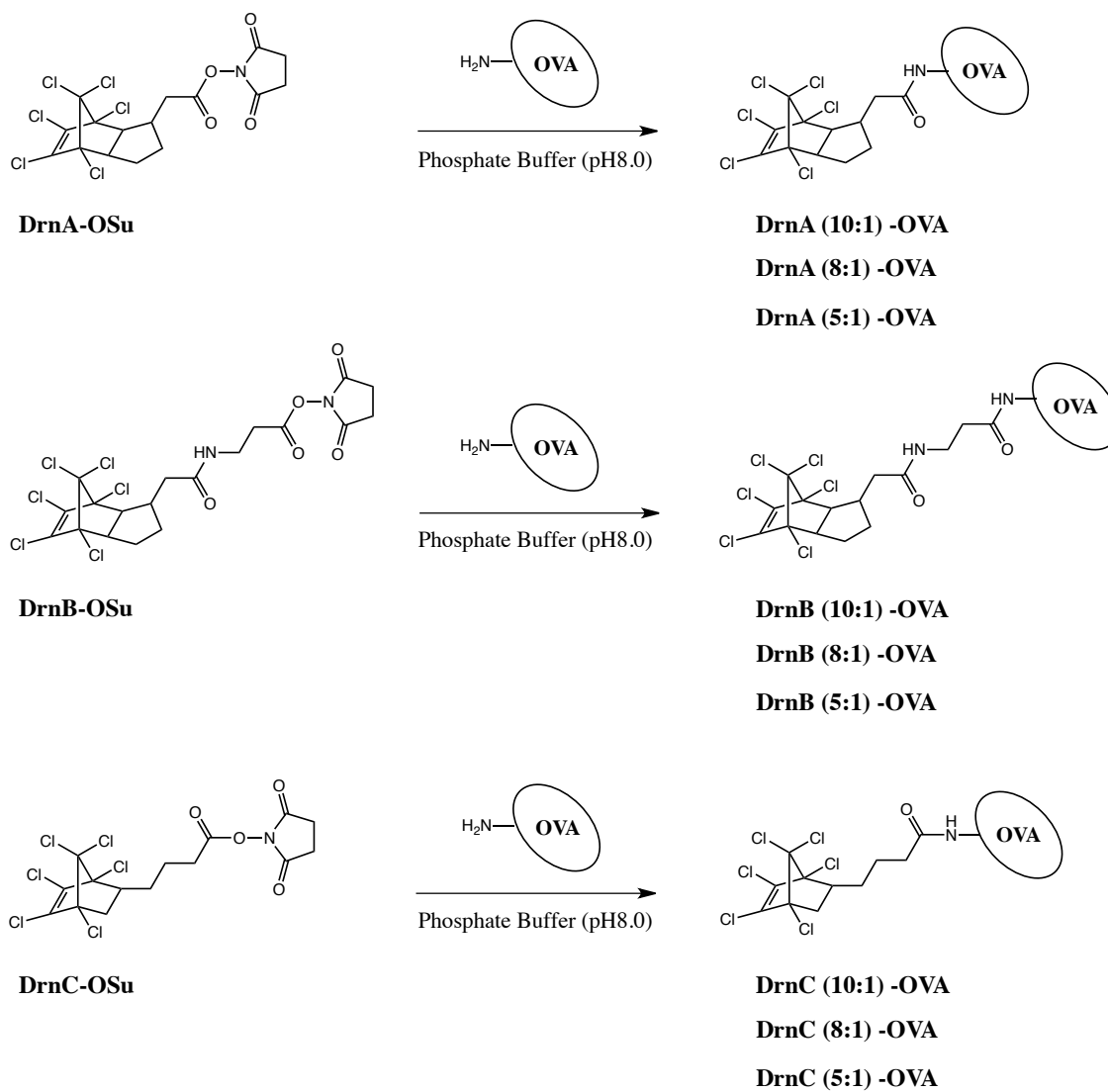


図 6. 3 種類のハプテンの OVA コンジュゲートの調製ルート

## 2-2-2. マウスの免疫

1 週間馴化した Balb/c マウス（7 週齢，雌，SPF）を 1 群 5 匹とし，前項で調製した 3 種類の免疫原（DrmA-BSA, DrmB-BSA, DrmC-BSA）を用いて免疫を行った．免疫原はそれぞれ Ribi アジュバントシステムと等量混合して乳化させたのち，初回 100  $\mu\text{g}/\text{body}$ ，2 回目以降 50  $\mu\text{g}/\text{body}$  を 2 週間間隔にてマウス腹腔内に投与した．3 回免疫後より 1 週間経過ののち，マウス尾静脈より採血し，ELISA，および，ic-ELISA により血中抗体価と特異性の推移を調べた．

### 抗体価測定法；

リン酸緩衝生理食塩水 (Phosphate buffered saline; PBS) にて 0.1～0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調製したハプテン-OVA コンジュゲート (DrmA-OVA, DrmB-OVA, DrmC-OVA, ハプテン : OVA モル比 ; 5:1, 8:1, 10:1) , 100  $\mu\text{L}$  を 96 ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに添加し，室温，1 時間静置した．Tween 20 含有 PBS で 3 回洗浄後にブロッキング試薬 250  $\mu\text{L}$  を加え，室温，2 時間静置した．再度マイクロタイタープレートを洗浄（3 回）したのち，プレートを 15°C 設定のインキュベーター上に置き，20  $\mu\text{L}$  の 50%メタノール-水を添加し，ついで 1% BSA で段階希釈したマウス抗血清（約 2～20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ） 80  $\mu\text{L}$  を加えた．両者を添加後，マイクロタイタープレートを室温下に静置し，1 時間反応させた．Tween 20 含有 PBS にてマイクロタイタープレートを洗浄（3 回）ののち，ブロッキング試薬にて 3000 倍希釈したパーオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体（ヤギ），100  $\mu\text{L}$  を添加し室温，1 時間反応させた．Tween 20 含有 PBS による洗浄（3 回）を再度行った後，TMB 試薬 100  $\mu\text{L}$  を加えて室温，15 分間静置ののち 1M リン酸 100  $\mu\text{L}$  により反応停止し，プレートリーダーにて吸光度を測定した（測定波長 : 450nm, 対象波長 : 630nm）

### ic-ELISA による特異性評価法；

PBS にて 0.1～0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に調製したハプテン-OVA コンジュゲート (DrmA-OVA, DrmB-OVA, DrmC-OVA, ハプテン : OVA モル比 ; 5:1, 8:1, 10:1) , 100  $\mu\text{L}$  を 96 ウエルマイクロタイタープレートの各ウエルに添加し，室温，1 時間静置した．Tween 20 含有 PBS で 3 回洗浄後にブロッキング試薬 250  $\mu\text{L}$  を加え，室温，2 時間静置した．再度マイクロタイタープレートを洗浄（3 回）したのち，20  $\mu\text{L}$  の 50%メタノール-水 (B0) ，或いは，100～1000 ng/mL に

調整したディルドリン，ヘプタクロル，HEPX（競合物質）の各 50%メタノール-水溶液（B）を添加した．ついで 1% BSA で段階希釈したマウス抗血清（約 10  $\mu\text{g/mL}$ ）80  $\mu\text{L}$  を加えて室温，1 時間反応させた．Tween 20 含有 PBS にてマイクロタイタープレートを洗浄（3 回）ののち，ブロッキング試薬にて 3000 倍希釈したパーオキシダーゼ標識抗マウス IgG 抗体（ヤギ），100  $\mu\text{L}$  を添加し室温，1 時間反応させた．Tween 20 含有 PBS による洗浄（3 回）を再度行った後，TMB 試薬 100  $\mu\text{L}$  を加えて室温，15 分間静置ののち 1M リン酸 100  $\mu\text{L}$  により反応停止し，プレートリーダーにて吸光度を測定した（測定波長：450nm，対象波長：630nm）

### 2-2-3. ハイブリドーマの作製

ハプテン-OVA コンジュゲート（DrmA-OVA, DrmB-OVA, DrmC-OVA）に対し十分な抗体価を示し，かつ、ic-ELISA を用いた特異性評価によりディルドリン，ヘプタクロル，HEPX の各々に対し，望ましい特異性を有すると判断されたマウスを各免疫原あたり 1～2 匹選抜した．選抜マウス尾静脈に最終免疫（免疫原量：50  $\mu\text{g/body}$ ）を行い，最終免疫より 3 日後にマウス脾臓細胞とマウス腫瘍細胞（SP2/O；ATCC CRL-1581）との細胞融合を行った．マウス腫瘍細胞，SP2/O は RPMI1640 培地（10% FCS，ペニシリン，ストレプトマイシン含有）中にてあらかじめ対数増殖期に至るよう維持し，PEG1500 を用いて，マウス脾臓細胞：SP2/O=5：1 の比率で融合処理した．HAT（ヒポキサンチン，アミノプテリン，チミジン）含有 RPMI1640 培地中に懸濁したのち，脾細胞濃度： $1 \times 10^5 \sim 2 \times 10^5$  cells/well になるよう 96 ウェル細胞培養用プレートに播種し，37°C，5% CO<sub>2</sub> 下に培養した．

### 2-2-4. ヘプタクロル類、ディルドリンを認識するモノクローナル抗体産生株の樹立

細胞融合より 7～10 日後，ハイブリドーマの増殖が見られたウェルの培養上清の抗体価を ELISA により測定（ハプテン-OVA コンジュゲート：0.02～0.5  $\mu\text{g/mL}$ ）し，抗体産生が確認されたウェルを選抜した．次に，産生された抗体の特異性の評価を ic-ELISA を用いて行い，ディルドリン，ヘプタクロル，HEPX 各々に対し高い反応性を示すウェルを中心にクローニング候補となるウェルを選抜した（ハプテン-OVA コンジュゲート：0.02～0.5  $\mu\text{g/mL}$ ，競合物質：0.2

～200 ng/mL)．選抜したウエルは限界希釈法にてクローニングを実施した．すなわち，Balb/c マウス（6～8 週齢，雌，SPF）より脾臓摘出し調製した脾臓細胞を，マウス 1 匹あたり 50mL の HT(ヒポキサンチン，チミジン)含有 RPMI1640 培地に懸濁してフィーダー細胞とした．クローニング候補となるウエルから細胞を回収し，血球計算板上で細胞数を計測し，それぞれ  $10^2$  cells/mL,  $10^1$  cells/mL になるようフィーダー細胞懸濁液にて調製して 100  $\mu$ L /well ずつ 96 ウエル細胞培養用プレートにまきこみ，37°C, 5% CO<sub>2</sub> インキュベーター内で培養した．細胞増殖がみられたウエルについて抗体価および産生抗体の特異性を評価し，再度クローニングを実施し，目的とする抗体価を産生するクローンがシングルクローンとなるまで抗体価測定とクローニング操作を 4～5 回繰り返すことによって，モノクローナル抗体産生細胞株を樹立した．

#### 2-2-5. マウス腹腔培養とモノクローナル抗体の精製

プリスタン前投与（0.5mL/body, 腹腔内）した BALB/c マウス（7～10 週齢，雌，SPF）腹腔に樹立したモノクローナル抗体産生株，約  $1 \times 10^7$  cells に移植した．1～2 週間経過ののち、細胞移植したマウスの腹部より腹水を回収し，遠心分離後の上清を回収した．モノクローナル抗体のアイソタイプ分析に基づき，精製には Protein G Sepharose 4 Fast Flow を担体とするアフィニティークロマトグラフィーを用いることとし，マウス腹水中よりモノクローナル抗体を単離した．なお，精製した抗体の濃度は抗体の分子吸光係数と抗体溶液の 280 nm における吸光度から，280 nm における吸光度＝1.4 の場合の抗体濃度＝1.0 mg/mL として算出した<sup>39)</sup>．

#### 2-2-6. 作製したモノクローナル抗体の評価

9 種類のハプテン-OVA コンジュゲート (DmA-OVA, DmB-OVA, DmC-OVA, ハプテン : OVA モル比 ; 5:1, 8:1, 10:1) と作製したモノクローナル抗体によるマッチングと反応条件を検討し，測定対象物（ディルドリン，ヘプタクロル，HEPX）に対する反応性と特異性を指標にモノクローナル抗体を 3 種類（DrA-04, DrB-03, DrC-02）選択した．10 % (v/v) メタノール-水の反応溶媒下に各抗体を用いた ic-ELISA を構築し，4 係数ロジスティックモデルにより検量線を作成して，ディルドリン，ヘプタクロル，HEPX に対する検出下限値を算出した<sup>40)</sup>．

さらに、測定対象を含むシクロジエン系農薬およびその代謝物（ヘプタクロルトランス-エポキシド、アルドリン、エンドリン、 $\alpha$ -エンドサルファン、 $\beta$ -エンドサルファン、エンドサルファン-サルフェイト、シス-クロルデン、トランス-クロルデン）との反応性評価を行い、それぞれの化合物に対する IC<sub>50</sub> 値（50% 反応阻害率を示す化合物の濃度）を元に交差反応性を求め、DrA-04, DrB-03, DrC-02 の各モノクローナル抗体の特異性を明らかにした。

## 2-3. 結果および考察

### 2-3-1. ハプテンの NMR 分析

<sup>1</sup>H NMR スペクトルは日本電子 JNM-ECA-500 を用いた。3 種類のハプテン分析結果を以下に示す。

#### ***2-(4,5,6,7,8,8-Hexachloro-2,3,3a,4,7,7a-hexahydro-1H-4,7-methanoinden-1-yl)acetic acid (DrnA).***

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  12.30 (br, 1H), 3.37 (dd,  $J$  = 15.0, 9.0 Hz, 1H), 3.00 (dd,  $J$  = 9.0, 6.0 Hz, 1H), 2.42 (dd,  $J$  = 15.5, 5.5 Hz, 1H), 2.28 (dd, 15.8, 8.8 Hz, 1H), 2.08 (m, 1H), 1.94 (m, 1H), 1.72 (m, 1H), 1.41 (m, 1H), 1.31 (m, 1H)

#### ***3-(2-(4,5,6,7,8,8-Hexachloro-2,3,3a,4,7,7a-hexahydro-1H-4,7-methanoinden-1-yl)acet-amido)propanoic acid (DrnB).***

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  12.20 (br, 1H), 7.99 (t,  $J$  = 5.5 Hz, 1H), 3.38-3.28 (m, 1H), 3.21 (m, 2H), 3.02 (dd,  $J$  = 9.5, 5.0 Hz, 1H), 2.35 (t, 2H), 2.21 (dd,  $J$  = 12.3, 5.0 Hz, 1H), 2.16-2.06 (m, 2H), 1.90 (m, 1H), 1.61 (m, 1H), 1.40-1.30 (m, 2H)

#### ***4-(1,4,5,6,7,7-Hexachlorobicyclo[2.2.1]hept-5-en-2-yl)butanoic acid (DrnC).***

<sup>1</sup>H NMR (500 MHz, DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  12.10 (br, 1H), 2.76 (m, 1H), 2.65 (dd,  $J$  = 12.0, 8.5 Hz, 1H), 2.21 (t,  $J$  = 6.8 Hz, 2H), 1.94 (dd,  $J$  = 12.5, 4.0 Hz, 1H), 1.65-1.55 (m, 1H), 1.55-1.45 (m, 2H), 0.95 (m, 1H)



### 2-3-2. ヘプタクロル類、ディルドリンを認識するモノクローナル抗体の評価

ヘプタクロル類、ディルドリンを認識するモノクローナル抗体産生株は、17種類を樹立した。抗体産生株の培養上清、および、アフィニティークロマトによる精製抗体のアイソタイプをマウスモタイパーアイソタイピングキット（BIO-RAD Cat. No.172-2055）にて評価したところ、いずれの抗体も H 鎖：IgG1, L 鎖： $\kappa$ であった。

図 7 に ic-ELISA の測定原理を、図 8 に、ic-ELISA において 4 係数ロジスティックモデルによって求められる検量線を示した。

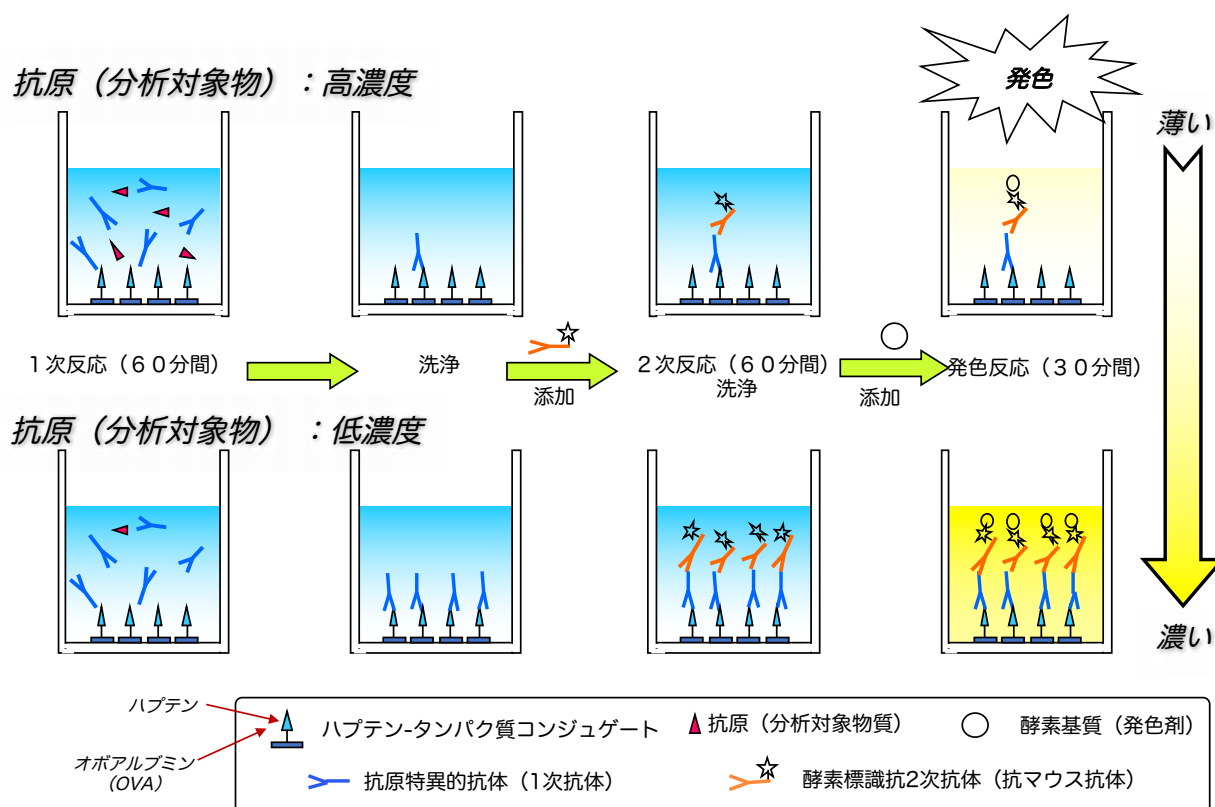


図 7. ic-ELISA の原理

ic-ELISA では、擬似抗原（本研究においてはハプテン-タンパク質コンジュゲート）を固相化し、抗原（測定対象物）と測定対象物特異的抗体（抗体に直接酵素を導入する，あるいは，酵素標識 2 次抗体を反応させる）を競合反応させたのち，固相に残る特異的抗体量を酵素活性により測定する方法である．測定対象物濃度が高い場合，固相に残る特異的抗体量は減少するため，図 8 のような検量線をとる．

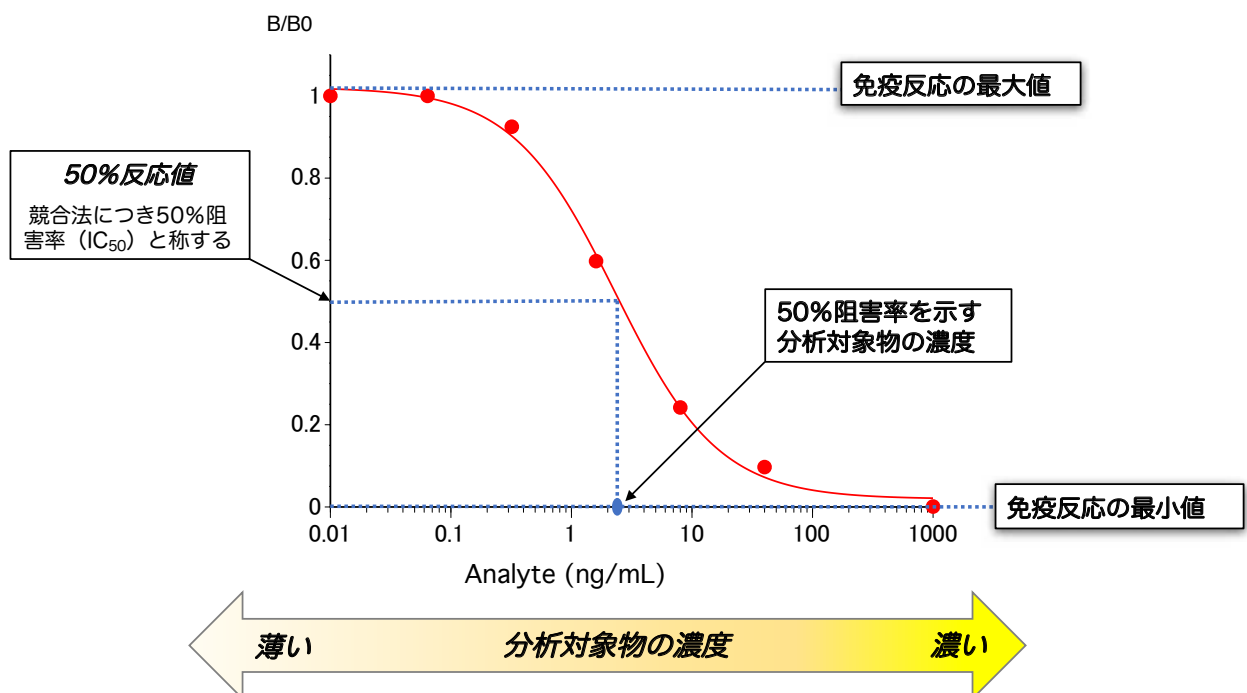


図 8. ic-ELISA の検量線モデル

### 2-3-2-1. ic-ELISA へのメタノールの影響

50% (v/v)メタノール-水を抽出溶媒とした土壌試料の 24 時間振とう抽出において、土壌からのヘプタクロル類抽出濃度とカボチャ移行濃度に高い相関性が報告されている<sup>41)</sup>ことから、土壌抽出溶媒としては 50% (v/v)メタノール-水が選択される。測定時の利便性から ic-ELISA の反応溶媒をメタノール-水とし、構築した ic-ELISA (使用抗体 : DrC-02) に及ぼすメタノールの影響について評価した。

メタノール含量の増加に伴い、ic-ELISA の反応値が低下する現象が観察されたことから、反応液中のメタノール量は少ない方が望ましいと判断された。一方、ヘプタクロル類・ディルドリンは水への溶解性が低く、溶液とするにはメタノールを必要とするため、ic-ELISA の反応溶媒として 10% (v/v)メタノール-水を選択した。

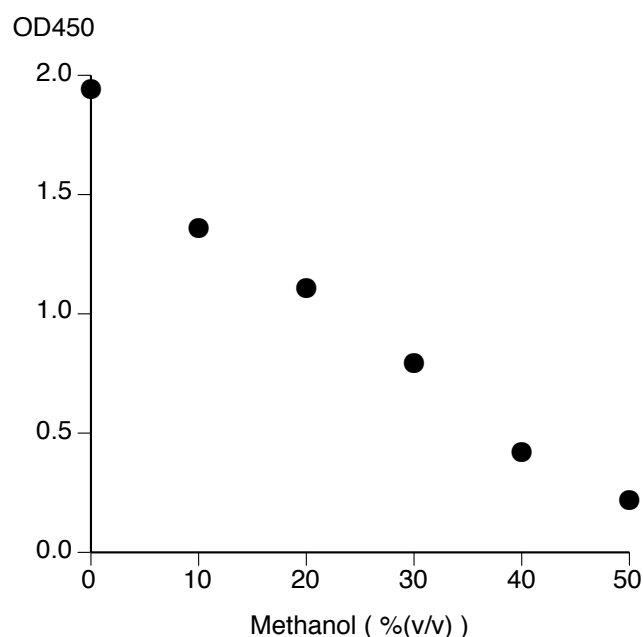


図 9. ic-ELISA に及ぼすメタノールの影響

### 2-3-2-2. ic-ELISA の構築

作製した 17 種類のモノクローナル抗体より、分析対象物質であるディルドリン、ヘプタクロル、HEPX に対し高い反応性を示すことが期待される抗体として DrA-04, DrB-03, DrC-02 の 3 種類を選択し、それぞれ ic-ELISA を構築した。固相化したハプテン-タンパク質複合体の種類と濃度、反応溶媒条件 (10% (v/v) メタノール-水)、モノクローナル抗体濃度、反応時間等の最適条件下、4 係数ロジスティックモデルにより作成した各モノクローナル抗体の検量線を図 10-a~10-c に示した (検量線のデータ数: n=3)。

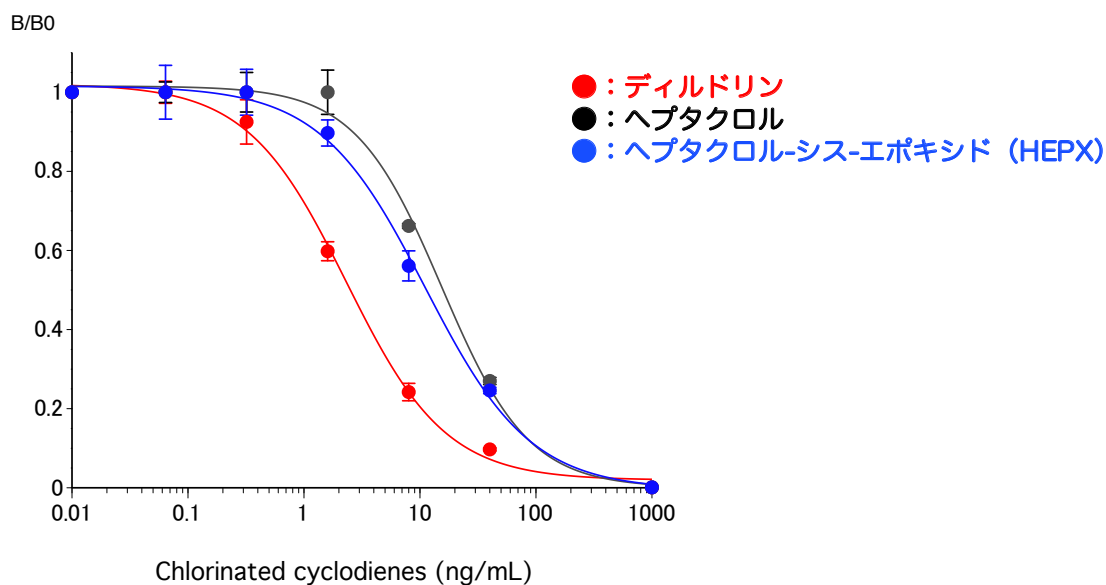


図 10-a. DrA-04 抗体を用いた ic-ELISA の検量線

固相化抗原濃度: DrB-OVA (8:1), 0.04  $\mu\text{g/mL}$ , DrA-04 抗体濃度: 0.02  $\mu\text{g/mL}$

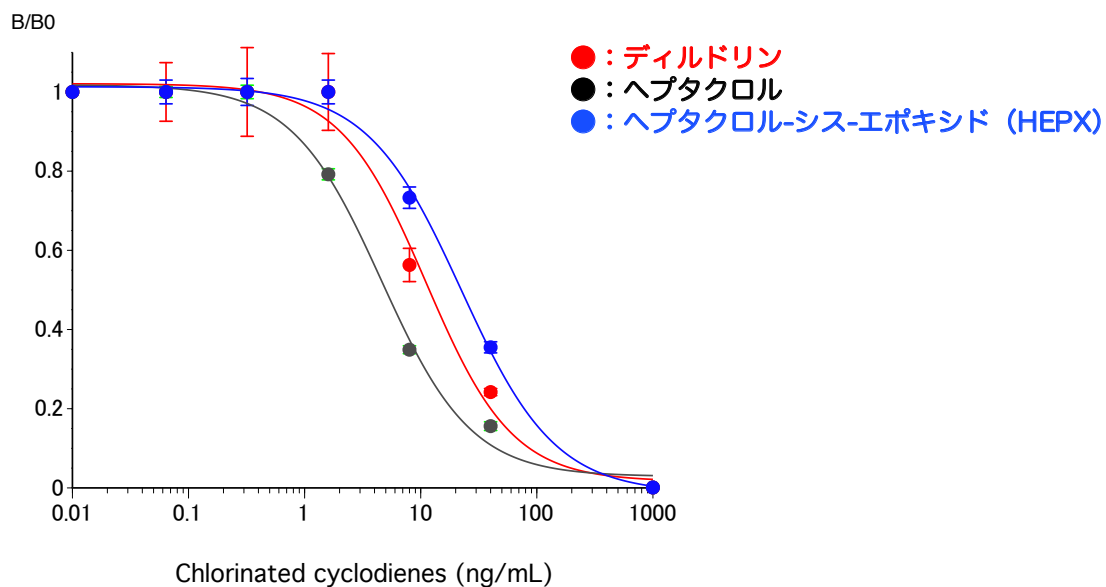


図 10-b. DrB-03 抗体を用いた ic-ELISA の検量線

固相化抗原濃度 : DrB-OVA (5 : 1), 0.05  $\mu\text{g/mL}$ , DrB-03 抗体濃度 : 0.01  $\mu\text{g/mL}$

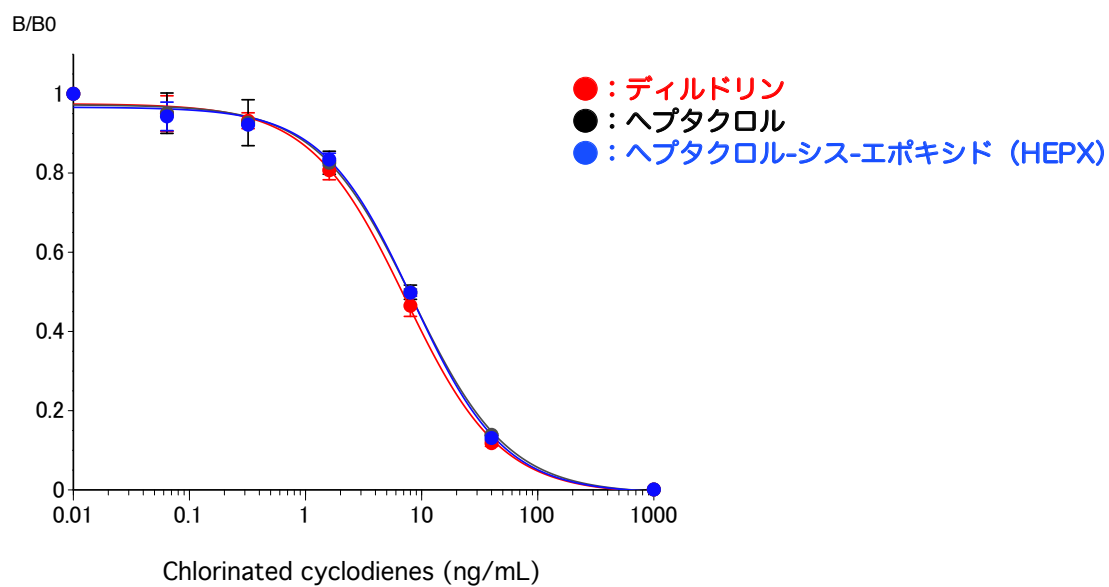


図 10-c. DrC-02 抗体を用いた ic-ELISA の検量線

固相化抗原濃度 : DrC-OVA (10 : 1), 0.05  $\mu\text{g/mL}$ , DrC-02 抗体濃度 : 0.02  $\mu\text{g/mL}$

図 10-a～図 10-c に示す検量線より求めたディルドリン，ヘプタクロル，HEPX の検出下限値を表 1 にまとめた．DrA-04 抗体を用いた ic-ELISA ではディルドリンに対し高い特異性と反応性を示し，DrB-03 抗体による ic-ELISA ではヘプタクロルに対し高反応性であった．また，DrC-02 抗体を用いた ic-ELISA は，ディルドリン，ヘプタクロル，HEPX にほぼ同等の反応性を示すことが明らかになった．

表 1. 各抗体を用いた ic-ELISA の検出感度

検出下限値 (ng/mL)	DrA-04 抗体	DrB-03 抗体	DrC-02 抗体
ディルドリン	0.40	8.58	1.40
ヘプタクロル	6.63	0.40	1.86
HEPX	2.57	4.18	1.34

### 2-3-2-3. 交差反応性の評価

DrA-04 抗体，DrB-03 抗体，DrC-02 抗体について交差反応性を評価した結果を表 2 に示した．交差反応性は次式で求められる．

$$\text{交差反応性 (\%)} = 100 \times [\text{IC}_{50} (\text{測定対象物質}) / \text{IC}_{50} (\text{交差反応性物質})]$$

測定対象物質の反応性：100 % とする．

交差反応性の評価に用いた化合物は，ディルドリン，ヘプタクロル，HEPX の他，ヘプタクロル-トランス-エポキシド，アルドリン，エンドリン， $\alpha$ -エンドサルファン， $\beta$ -エンドサルファン，エンドサルファン-サルフェイト，シス-クロルデン，トランス-クロルデンの 8 種類のシクロジエン系農薬およびその代謝物の計 11 種類とした．

本検討の結果，DrA-04 抗体はディルドリンに高い反応性を示すとともに，ヘプタクロル-トランス-エポキシド，エンドリンに対し高反応性を示しており，エンドサルファンやその分解物（エンドサルファンサルフェイト）に対して約

40 %の交差反応性を有していた。DrB-03 抗体はディルドリンに対し 41 %の交差反応性を有するが、ヘプタクロルに高反応性、かつ、高い特異性を示した。一方、DrC-02 抗体は、ヘプタクロルトランス-エポキシドに最も高い反応性を示したものの、ディルドリン、ヘプタクロル、および、HEPX に対し、ほぼ同等の交差反応性を有していた。該抗体は比較的広範な交差反応性を示したが、DrA-04 抗体や DrB-03 抗体に比べて HEPX に対し高い反応性を有すると判断された。

表 2. モノクローナル抗体のシクロジエン系農薬およびその代謝物との交差反応性

農薬および代謝物	DrA-04抗体	DrB-03抗体	DrC-02抗体
ディルドリン	100	41	116
ヘプタクロル	15	100	99
ヘプタクロル-シス-エポキシド (HEPX)	21	20	100
ヘプタクロル-トランス-エポキシド	100	7	200
アルドリン	9	0.8	30
エンドリン	104	2	83
$\alpha$ -エンドサルファン	11	0.6	Pr
$\beta$ -エンドサルファン	40	2	60
エンドサルファンサルフェイト	41	Pr	Pr
シス-クロルダン	18	Pr	Pr
トランス-クロルダン	5	Pr	Pr

\* IC<sub>50</sub> = 50%阻害率を示す農薬の濃度

\* 交差反応性 (%) =  $100 \times [\text{IC}_{50}(\text{測定対象物質}) / \text{IC}_{50}(\text{交差反応性物質})]$

\* Pr : 交差反応性物質濃度 200 ng/mL (40 ng/mL/assay) の高濃度においても阻害率が 30%以下の低い交差反応性を示す場合である。

### 2-3-3 特異性が異なる 2 種類の抗体を用いた ic-ELISA による混在下における ディルドリンおよびヘプタクロル類の測定方法の構築

#### 2-3-3-1. モノクローナル抗体の特異性に基づく標準品混合液中のディルドリン およびヘプタクロル類の濃度推定式

ディルドリンおよびヘプタクロル類（ヘプタクロルと HEPX）の標準品混合液 6 種類は表 1 に示す組成にて調製した。なお、標準混合液 A～F 中のディルドリン・ヘプタクロル類の総濃度は 40 ng/mL (8 ng/mL/assay)とした。

ディルドリンに高い反応性を示す DrA-04 抗体, ヘプタクロルに高反応性を有する DrB-03 抗体, および, ディルドリン, ヘプタクロル, HEPX に対しほぼ同等の反応性を示す DrC-02 抗体を用いた ic-ELISA により 6 種類の標準混合液 A～F を測定し, 各混合液の検量線の挙動を評価した。DrA-04 抗体と DrC-02 抗体の特異性に基づき, 混合液中のディルドリンとヘプタクロル類（HEPX として換算）を算出する計算式を導いた。計算式を検証するため, DrA-04 抗体と DrC-02 抗体を抗体を用いた ic-ELISA により標準混合液 A～F を測定, それぞれの ic-ELISA 値から算出されたディルドリンとヘプタクロル類の計算値と理論値との比較検討を行った。

表 3. 標準品混合液中のディルドリン・ヘプタクロル類の組成比

標準品混合液	ディルドリン	ヘプタクロル	HEPX
混合液A	2	1	1
混合液B	1	1	1
混合液C	0.4	1	1
混合液D	1	0.1	1.9
混合液E	1	0.2	1.8
混合液F	1	0.4	1.6



図 11 は 6 種類の標準品混合液のうちヘプタクロルと HEPX の比率を固定し、ディルドリンとヘプタクロル類の混合比率を変更した混合液 A, B, C (表 4) を, 3 種類のモノクローナル抗体 (DrA-04, DrB-03, DrC-02) の ic-ELISA にて測定した場合の検量線の挙動を示したものである. なお, 各検量線は 4 係数ロジスティックモデルに基づき作成した. DrA-04 抗体ではディルドリン存在量の多い混合液 (ディルドリン含量: 混合液 A > 混合液 B > 混合液 C) の場合ほど検量線が高感度側にシフトしており ( $IC_{50}$ , 混合液 A: 2.95 ng/mL, 混合液 B: 5.16 ng/mL, 混合液 C: 7.03 ng/mL), ic-ELISA の測定値は混合液中のディルドリン存在量に影響されると判断された. 一方, DrB-03 抗体 (混合液 A~C の  $IC_{50}$ : 7.70~9.79 ng/mL), および, DrC-02 抗体 (混合液 A~C の  $IC_{50}$ : 9.41~11.3 ng/mL) では, 混合液 A, B, C の検量線において有意差が認められなかったことから, 両抗体による ic-ELISA 値は混合液中のディルドリン存在量の影響を受けないものと考えられた. また, ディルドリンとヘプタクロル類の比を 1:2 とし, ヘプタクロルと HEPX の混合比を変更した混合液 D, E, F (表 5) を, 3 種類のモノクローナル抗体 (DrA-04, DrB-03, DrC-02) を用いた ic-ELISA にて測定した場合の検量線の挙動を図 12 に示した. 各検量線は混合液 A, B, C 測定の場合と同様に 4 係数ロジスティックモデルに基づき作成した. DrA-04 抗体 (混合液 D~F の  $IC_{50}$ : 4.00~4.50 ng/mL), DrB-03 抗体 (混合液 D~F の  $IC_{50}$ : 13.6~17.0 ng/mL), DrC-02 抗体 (混合液 D~F の  $IC_{50}$ : 11.1~12.2 ng/mL) のいずれにおいても検量線に有意差は見られず, 混合液中のヘプタクロルと HEPX の含有比率に影響を受けないものと考えられた.

DrA-04 抗体を用いた ic-ELISA の測定値はディルドリンの存在量に影響を受け, ディルドリン存在量が多いほど測定値は高い値を示すが, ヘプタクロル類 (HEPX とヘプタクロル) の組成比にほとんど影響されなかった. 一方, DrC-02 抗体は, ディルドリン存在量, ヘプタクロル類の組成比のいずれにもほとんど影響を受けなかった. すなわち, DrA-04 抗体による ic-ELISA 測定値と DrC-02 抗体による ic-ELISA の測定値は, 共にディルドリンとヘプタクロル類の総和として求められるが, ディルドリン存在量が多くなると DrA-04 抗体と DrC-02 抗体の ic-ELISA 測定値は乖離する. 以上の結果から, DrA-04 抗体と DrC-02 抗体それぞれを用いた ic-ELISA は, ディルドリンとヘプタクロル類混合液の分析に役立つものと推察した.

分析対象となる圃場で使用された農薬は主としてヘプタクロルであり、一部、ディルドリンの混入の可能性を有する。このため、ディルドリンとヘプタクロル類の混在下に各々の存在量を推定可能な本法は、実際の圃場に残留するヘプタクロル類の分析に役立つものと期待される。

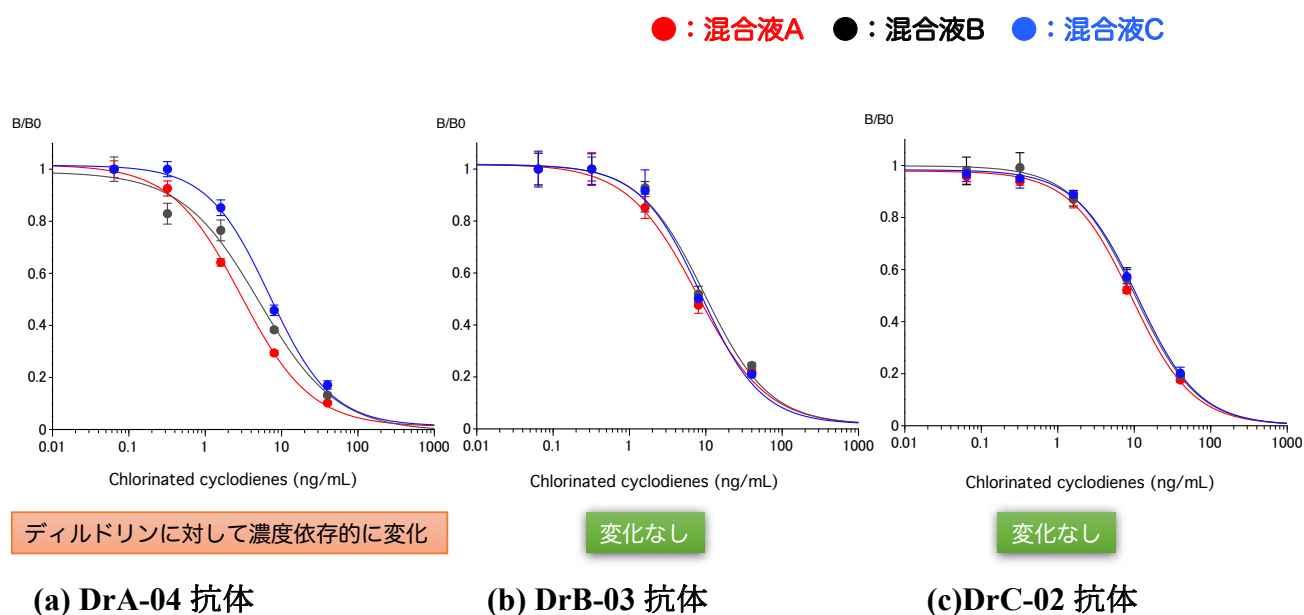


図 11. 標準品混合液 A～C に対するモノクローナル抗体の反応性

表 4. 標準品混合液 (A～C) 中のディルドリン・ヘプタクロル類の組成比  
混合物の組成比 :

ヘプタクロルと HEPX の比を固定し、ディルドリンとヘプタクロル類の比率を変化

標準品混合液	ディルドリン	ヘプタクロル	HEPX
混合液A	2	1	1
混合液B	1	1	1
混合液C	0.4	1	1

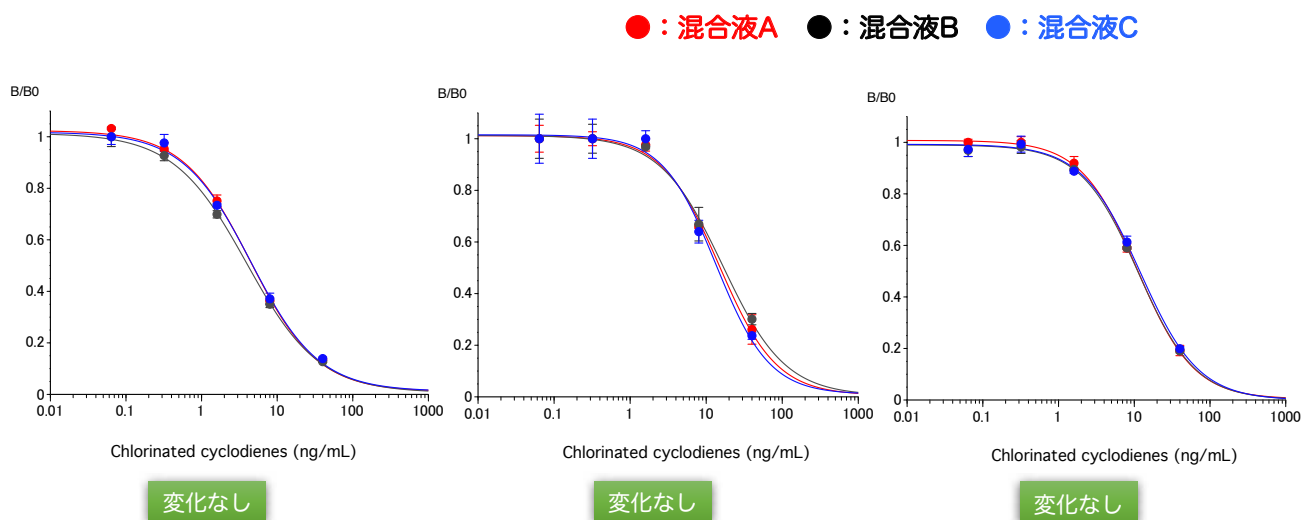


図 12. 標準品混合液 D～F に対するモノクローナル抗体の反応性

表 5. 標準品混合液 (D～F) 中のディルドリン・ヘプタクロル類の組成比

混合物の組成比：

ディルドリンとヘプタクロル類の比を 1 : 2 に固定し、ヘプタクロルと HEPX の比率を変化

標準品混合液	ディルドリン	ヘプタクロル	HEPX
混合液D	1	0.1	1.9
混合液E	1	0.2	1.8
混合液F	1	0.4	1.6

DrA-04 抗体, および, DrC-02 抗体のディルドリン, HEPX に対する特異性に  
基づき, 標準品混合液中のディルドリンおよびヘプタクロル類の濃度推定の計  
算式を以下のように求めた.

式 (5) より混合液中のディルドリン濃度が, 式 (6) より混合液中のヘプタ  
クロル類濃度が算出される.

***X* : HEPX 換算値 (DrA-04)      *Y* : HEPX 換算値 (DrC-02)**

***D* : ディルドリン濃度                  *Hs* : ヘプタクロル類濃度**

DrA-04 抗体の HEPX への交差反応率を算出

$$\text{交差反応率 (Dieldrin / HEPX)} = 100 / 21 = 4.76 \quad \text{式 (1)}$$

DrA-04 抗体を用いた ic-ELISA の検量線から求められる HEPX 換算値 (ng/mL)  
= **X** は次式となる

$$X = D_{(ng/mL)} \times 4.76 + Hs_{(ng/mL)} \quad \text{式 (2)}$$

DrC-02 抗体のディルドリンへの交差反応率を算出

$$\text{交差反応率 (HEPX / Dieldrin)} = 100 / 116 = 0.86 \quad \text{式 (3)}$$

DrC-02 抗体を用いた ic-ELISA の検量線から求められる HEPX 換算値 (ng/mL)  
= **Y** は次式となる

$$Y = D_{(ng/mL)} \times 0.86 + Hs_{(ng/mL)} \quad \text{式 (4)}$$

式(2) および式 (4) から

$$D_{(ng/mL)} = (X - Y) / (4.76 - 0.86) = (X - Y) / 3.90 \quad \text{式 (5)}$$

式 (4) を書き換えると

$$Hs_{(ng/mL)} = Y - D \times 0.86 \quad \text{式 (6)}$$

### 2-3-3-2. モノクローナル抗体の特異性に基づく標準品混合液中のディルドリンおよびヘプタクロル類の濃度推定式の検証

DrA-04 抗体を用いた ic-ELISA と DrC-02 抗体を用いた ic-ELISA により標準品混合液 A～F を測定し、それぞれの ic-ELISA 値より混合液 A～F 中のディルドリン、および、ヘプタクロル類の濃度を算出した結果を表 6 に示した。なお、土壌中のヘプタクロルはほぼ HEPX に代謝されることから、ヘプタクロル類は HEPX 量として算出した。

式 (5) と式 (6) からそれぞれ得られたディルドリン、および、ヘプタクロル類の計算値の理論値からの乖離度はディルドリンで 96.2～115 %、ヘプタクロル類で 88.1～125 % の範囲であり、理論値と好ましい近似を示した。

本検討の結果から、DrA-04 抗体を用いた ic-ELISA と DrC-02 抗体の ic-ELISA を用いることによって、ディルドリン、および、ヘプタクロル類混在下に各々の含量を算出可能であると考えられた。

今後の課題として、実試料である圃場より採取した土壌試料を用いての検討が望まれるが、複合汚染下、機器分析と同じく混在する個々の農薬類の存在量を求めることが可能な本法は、測定値しか得られず測定値の中身が不明であるという免疫測定法の弱点を解消し、複合汚染下においても免疫測定法の有用性を示しうる効果的な手法であると判断された。

表 6. 特異性の異なる 2 種類の抗体 (DrA-04, DrC-02) を用いる ic-ELISA 値に基づく標準混合液中のディルドリンおよびヘプタクロル類の濃度推定

標準混合液	計算値 (ng/mL/assay)		理論値 (ng/mL/assay)		計算値／理論値 (%)	
	ディルドリン	ヘプタクロル類	ディルドリン	ヘプタクロル類	ディルドリン	ヘプタクロル類
混合液A	4.36	4.25	4.00	4.00	109	106
混合液B	2.39	5.95	2.67	5.34	89.5	112
混合液C	1.17	6.99	1.33	6.66	88.1	105
混合液D	3.03	5.39	2.67	5.33	114	102
混合液E	3.34	5.13	2.67	5.33	125	96.2
混合液F	3.03	5.40	2.67	5.33	114	101

\* 標準混合液の ic-ELISA (DrA-04 抗体系 および DrC-02 抗体系) による測定: データ数 n=3

\* 標準混合液中のディルドリン濃度: 計算式 (5) に基づく。

\* 標準混合液中のヘプタクロル類濃度: 計算式 (6) に基づく。

#### 2-3-4. ic-ELISA の評価（精度とスパイク試験）

DrA-04 抗体, および, DrC-02 抗体を用いた ic-ELISA については, 測定法の精度（日差変動・日間変動）とスパイク試験を行い ic-ELISA の信頼性の評価とした. スパイク試験については, グラファイトカーボン処理済みの土壤抽出液（GC-MS 分析によりディルドリン, および, ヘプタクロル類不含と判明している試料）に対して HEPX 標準品を添加し, 回収率を求めた

DrA-04 抗体, および, DrC-02 抗体を用いた ic-ELISA の精度評価と回収率試験結果を表 7 に示した. DrA-04 抗体の ic-ELISA（測定対象；ディルドリン）の日差変動は 5.0～5.9%, 日間変動は 2.6～3.9% であり, DrC-02 抗体の ic-ELISA（測定対象；HEPX）の日差変動は 1.3～1.5%, 日間変動は 6.2～4.2% であったことから測定系として十分な測定精度を有すると判断した.

また, グラファイトカーボン処理を行った土壤抽出液（ディルドリン, ヘプタクロル類を含まないことを GC-MS 分析により確認済み）に対し, ディルドリン（DrA-04 抗体）, あるいは, HEPX（DrC-02 抗体）を 4 ng/mL/assay, 20 ng/mL/assay 添加した場合の回収率は, DrA-04 抗体の ic-ELISA で 88.8–108%, DrC-02 抗体の ic-ELISA では 85.8–129% の値を得た. スパイクを行っていないバックグラウンド試料では一部を除いて検出下限値以下の値を得ており, 偽陽性が認められなかった. 以上の結果から, 構築した ic-ELISA は土壤試料に対しても適応可能な信頼性の高い測定法であると考えられた.

表 7. ic-ELISA の精度評価と回収率試験

ic-ELISA		DrA-04抗体	DrC-02抗体
測定対象物質		ディルドリン	HEPX
測定対象非存在下の吸光度 (B0)		1.191	1.396
日差変動	8.0 ng/mL, CV (%)	5.9	1.5
	40.0 ng/mL, CV (%)	5.0	1.3
日間変動	8.0 ng/mL, CV (%)	3.9	6.2
	40.0 ng/mL, CV (%)	2.6	7.2
リカバリー テスト	土壌A	バックグラウンド値(ng/mL)	nd
		スパイク量 4 ng/mL/assay 時の 回収率 (%)	97.5
		スパイク量 20 ng/mL/assay時の 回収率 (%)	101
	土壌 B	バックグラウンド値(ng/mL)	0.68
		スパイク量 4 ng/mL/assay 時の 回収率 (%)	108
		スパイク量 20 ng/mL/assay時の 回収率 (%)	129

\* nd : 検出下限値以下.

\* 日差変動 : データ数 n=3,

\* 日間変動 : 異なる 3 日間における n=3 のバラツキ.

\* リカバリーテスト : グラファイトカーボン処理を行った土壌抽出液に対し, 測定対象物質をスパイクして各抗体を使用した. ic-ELISA にて測定し, スパイク量を 100%として回収率を求めた.

### 第3章 免疫測定法に適した土壌試料前処理法の構築

#### 3-1. はじめに

酵素免疫法 (enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) に代表される免疫測定法は体外診断用医薬品などの臨床検査に活用されており、信頼性の高い実績のある測定法である。多検体を一度に分析でき、操作も簡便である免疫測定法は農作物や環境中の残留農薬などの微量の環境負荷物質の分析<sup>42), 43)</sup>、加工食品中の食物アレルギー分析<sup>44)</sup>等、臨床検査以外の分野にも応用されている。

POPs に指定されるシクロジエン系農薬のヘプタクロルは 1972 年に農薬登録が失効したが、その主要代謝産物であるヘプタクロル-シス-エポキシド (HEPX) が一部未分解のヘプタクロルと共に土壌中に長期に残留し、カボチャから残留基準値 ( $0.03 \text{ mg Kg}^{-1}$ ) を上回る濃度で検出される事例が報告されている<sup>17)</sup>。

我々はシクロジエン系農薬分析に適したモノクローナル抗体を複数作製し、これらの抗体を利用した ic-ELISA を開発している<sup>45)</sup>ことから、土壌残留ヘプタクロル類 (ヘプタクロル、および、HEPX) の分析にこれらの ic-ELISA を最適化して用いることを検討した。

臨床検査の検体である体液とは異なり環境試料には不特定の種々のマトリクスが含まれており、ic-ELISA を有効に活用するためには多くの場合、適切な試料調製が必要である<sup>46), 47)</sup>。圃場においても様々な有機物が含まれ 1 圃場内の土壌の状態や組成も異なるとことから、これらの因子が ic-ELISA への妨害影響となり得るため、適切な土壌試料調製法の構築が重要課題と考えられる。50% (v/v) メタノール-水を抽出溶媒とする土壌の 24 時間振とう抽出では、土壌からのヘプタクロル類抽出濃度とカボチャ移行濃度に高い相関性が報告されている<sup>41)</sup>ことから、土壌抽出溶媒として 50% (v/v) メタノール-水が選択される。しかしながら、親水性有機溶媒により土壌試料の抽出を行った場合、有機物などの多量の水溶性夾雑物が抽出液に混入し、ic-ELISA への妨害影響が見られることが報告されている<sup>48)</sup>。これらの妨害物質の効率的な除去のため、土壌抽出液中のヘプタクロル類の精製法としてグラファイトカーボンと新規高機能担体である E-HyCu<sup>®</sup><sup>49)</sup>を用いたマトリクス固相分散 (matrix solid phase dispersion : MSPD) 法<sup>50)</sup>の検討を行った。



### 3-2. 材料および方法

#### (1) シクロジエン系農薬および誘導体

ヘプタクロル, および, HEPX 標準品は Dr. Ehrenstorfer GmbH より購入した.

#### (2) 溶媒および塩類

分析グレードのメタノール, アセトニトリル, DMSO の親水性有機溶媒, リン酸, および, 塩化ナトリウム, 塩化カリウム, リン酸二ナトリウム 12 水, リン酸二カリウムの塩類はナカライテスクより購入した. なお, 実験に使用する水は, 全て Milli-Q 水製造装置 (Merck Millipore) で調製した.

#### (3) 前処理用担体

グラファイトカーボンは Agilent Technologies より購入し, E-HyCu<sup>®</sup>は森永生科学研究所より購入した.

#### (4) 免疫測定用試薬および器具

界面活性剤である Tween 20 は BIO-RAD 製, オボアルブミン (OVA) は SIGMA-ALDRICH 製を用いた. パーオキシダーゼ (HRP, maleimide activated) は ThermoFischer Scientific より購入し, ic-ELISA の基質である TMB Microwell Peroxidase Substrate System (TMB) は Kirkegaard & Perry Laboratories, Inc. 製を使用した. 96 ウエルマイクロタイタープレートは Corning Inc. 製を用い, モノクローナル抗体は第 2 章で作製した DrC-02 抗体を HRP 標識して使用した. 測定試料の分注用 96 ウエルプレートは Greiner Bio-One 製を, ic-ELISA に用いる 96 ウエルマイクロタイタープレートは Corning Inc. 製を使用した. また, マイクロタイタープレートの洗浄には Bio Washer-50 (大日本住友製薬) を用い, プレートリーダーとしては Chro Mate<sup>®</sup> (Awareness Technology Inc.) を使用した.

#### 3-2-1. ヘプタクロル類測定のための ic-ELISA の最適化

競合物質である DmC-OVA (10 : 1) (0.08ng/mL, 100  $\mu$ L) を固相化しブロッキング処理をした 96 ウエルマイクロタイタープレートに, 25% (v/v) DMSO-水で調製した測定試料 20  $\mu$ L を添加した. 次に, 80  $\mu$ L の HRP 標識 DrC-02 抗体

(0.04 ng/mL, 100  $\mu$ L) を加えて室温, 1 時間, 静置して反応させた. 反応終了後, 0.05% Tween 20 含有リン酸緩衝液を用いてプレートを洗浄した. 100  $\mu$ L の TMB 溶液を加えて室温 10 分間反応ののち, 100  $\mu$ L の 1M リン酸を添加して反応を停止し, プレートリーダーで吸光度 (測定波長: 450 nm, 対象波長: 630 nm) を測定した. 測定対象物質非存在下での ic-ELISA の測定値 (B0) を 100% として測定試料の値 (B) から B/B0 値を求め, 標準物質である HEPX の検量線を 4 係数ロジスティックモデルにより作成した. 本検量線より測定試料中のヘプタクロル類の量を算出した.

### 3-2-2. 土壌抽出液の調製

土壌試料として「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業, 安全・安心なかぼちゃ生産に向けた土壌残留ヘプタクロル類診断技術の開発 (26074C)」研究より供出された灰色低地土および黒ボク土を使用した.

Sakai らの報告<sup>41)</sup>に準じて, 土壌 8 g (乾燥重量) を 40 mL (固液比 1 : 5) の 50% (v/v) メタノール-水に懸濁して, 25°C 下 24 時間往復振とうののち遠心分離 (3000 rpm, 10 分間) を行い, 上清を土壌抽出液として回収し, 以後の実験に使用した.

### 3-2-3. グラファイトカーボン担体による土壌抽出液の前処理の検討

#### 3-2-3-1. グラファイトカーボン担体による吸脱着効果

グラファイトカーボン粉末 (150 mg) を試験管に秤量し, 50% (v/v) メタノール-水に溶解した HEPX 標準品 (10 ng/mL) 5 mL を加えて vortex にて 30 秒間攪拌した. 遠心分離 (3500 rpm, 1 分間) 後, 上清を廃棄ののち, 50% (v/v) メタノール-水 2 mL を加えてグラファイトカーボン粉末を懸濁し, フリットのついた空のリザーバー (6 mL 容量) に移した. 50% (v/v) メタノール-水 2 mL を加えて試験管内に残るグラファイトカーボン粉末を洗い込み, この洗い込み液を上記リザーバーに加えた. ついで, 溶媒を除いたのち加圧乾燥を行った. リザーバー先端の開口部をキャップで閉じたのち, アセトニトリル 2 mL を添加し, vortex にて 30 秒間攪拌した. リザーバー先端のキャップを外してアセトニトリルを溶出後, リザーバー内にアセトニトリル 5 mL を加えて溶出液を回収した. 溶出液を HEPX 標準品溶出液としてエバポレーターにより

濃縮乾固したのち、0.25 mL の DMSO を加えて溶解後、水 0.75 mL を混合して 25% (v/v) DMSO 溶液を調製し、ic-ELISA の測定試料とした。

### 3-2-3-2. グラファイトカーボン担体用いた MSPD 法による土壌抽出液の精製

グラファイトカーボン粉末 (150 mg) を試験管に秤量したのち、土壌抽出液 5 mL (土壌 1 g 相当) を加えて vortex にて 30 秒間攪拌した。遠心分離 (3500 rpm, 1 分間) ののち上清を廃棄し、50% (v/v) メタノール-水 5 mL を加え 10 秒間 vortex にて攪拌した。遠心分離を行い、上清を廃棄したのち、再度 50% (v/v) メタノール-水 2 mL を加えてグラファイトカーボン粉末を懸濁し、その懸濁液をフリットのついた空のリザーバー (6 mL 容量) に移した。50% (v/v) メタノール-水 2 mL にて試験管内に残るグラファイトカーボン粉末を洗い込み、この洗い込み液を上記リザーバーに加えた。50% (v/v) メタノール-水 2 mL を用いて洗浄したのち、加圧乾燥を行った。リザーバー先端の開口部をキャップで閉じ、アセトニトリル 2 mL を添加して 30 秒間 vortex にて攪拌した。次に、リザーバー先端のキャップを外してアセトニトリルを溶出させた。再度、5 mL のアセトニトリルをリザーバーに加えて溶出液を回収し、HEPX 標準品溶出液とした。溶出液をエバポレーターにより濃縮乾固したのち、0.25 mL の DMSO を加えて溶解後、水 0.75 mL を混合して 25% (v/v) DMSO 溶液を調製し、ic-ELISA の測定試料とした。

### 3-2-4. グラファイトカーボン/E-HyCu<sup>®</sup>担体を用いた MSPD 法による土壌抽出液前処理法の構築

試験管に量り取ったグラファイトカーボン粉末 (150 mg) に対し、土壌抽出液 5 mL (土壌 1 g 相当) を加えて vortex にて 30 秒間攪拌した。遠心分離 (3500 rpm, 1 分間) して上清を廃棄したのち、50% (v/v) メタノール-水 5 mL を加え 10 秒間 vortex にて攪拌した。再度、遠心分離を行い、上清を廃棄した。50% (v/v) メタノール-水 2 mL を加えてグラファイトカーボン粉末を懸濁させ、この懸濁液をフリットのついた空のリザーバー (6 mL 容量) に移した。試験管内に残るグラファイトカーボン粉末に 50% (v/v) メタノール-水 2 mL を用いて洗い込みし、洗い込み液を上記リザーバーに加えた。リザーバー内に 50% (v/v) メタノール-水 2 mL にて洗浄後、加圧乾燥を行った。次に、リザーバー内に E-HyCu<sup>®</sup>粉末 (250 mg) を加えてリザーバー先端の開口部をキャップで閉じたの

ち、アセトニトリル 2 mL を添加した。 vortex にて 30 秒間攪拌したのち、リザーバー先端のキャップを外してアセトニトリルを溶出させた。さらに、リザーバー内にアセトニトリル 5 mL を加えて溶出液を回収した。回収した溶出液は、ヘプタクロル類溶出液としてエバポレーターにより濃縮乾固した。濃縮乾固したのち 0.125 mL の DMSO を加えて溶解した。次に、水 0.375 mL を混合して 25% (v/v) DMSO 溶液を調製し、この試料を ic-ELISA の測定試料とした。グラファイトカーボン／E-HyCu<sup>®</sup>担体を用いた MSPD 法による土壌抽出液前処理法の流れを図 13 に示した。

「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業、安全・安心なかぼちゃ生産に向けた土壌残留ヘプタクロル類診断技術の開発 (26074C)」研究より供出された土壌試料 12 検体について、上述のグラファイトカーボン／E-HyCu<sup>®</sup>担体を用いた MSPD 法により土壌抽出液の前処理法を行い、3-2-1 項で最適化した ic-ELISA にて測定を行った。ic-ELISA 分析値と GC-MS 分析値との相関性を比較することにより、土壌試料前処理法を評価した。

なお、土壌試料の GC-MS 分析値については供試土壌と同じく、「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業、安全・安心なかぼちゃ生産に向けた土壌残留ヘプタクロル類診断技術の開発 (26074C)」研究より提供された分析値を使用した。

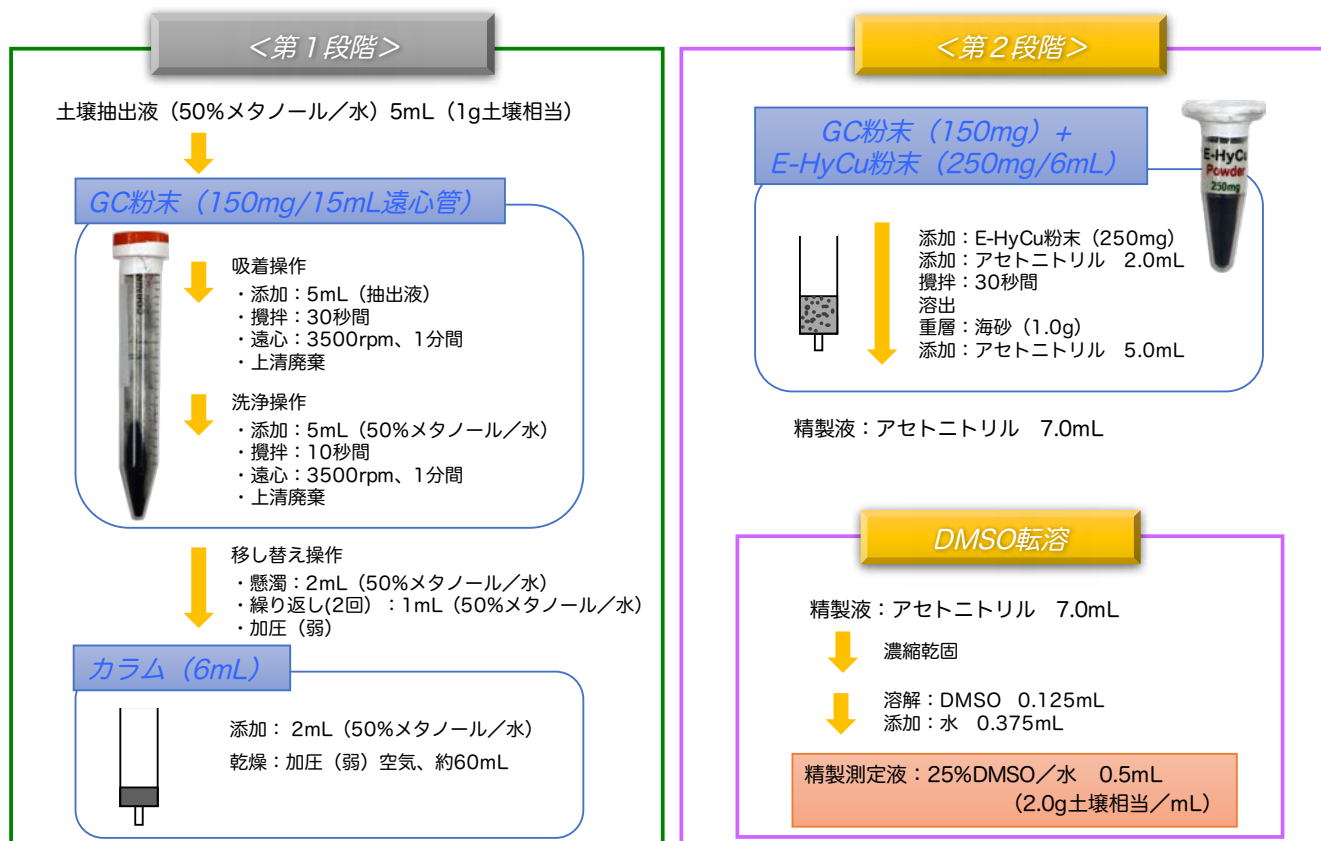


図 13. グラファイトカーボン/E-HyCu<sup>®</sup>担体を用いた MSPD 法による土壌抽出液前処理法

### 3-3. 結果および考察

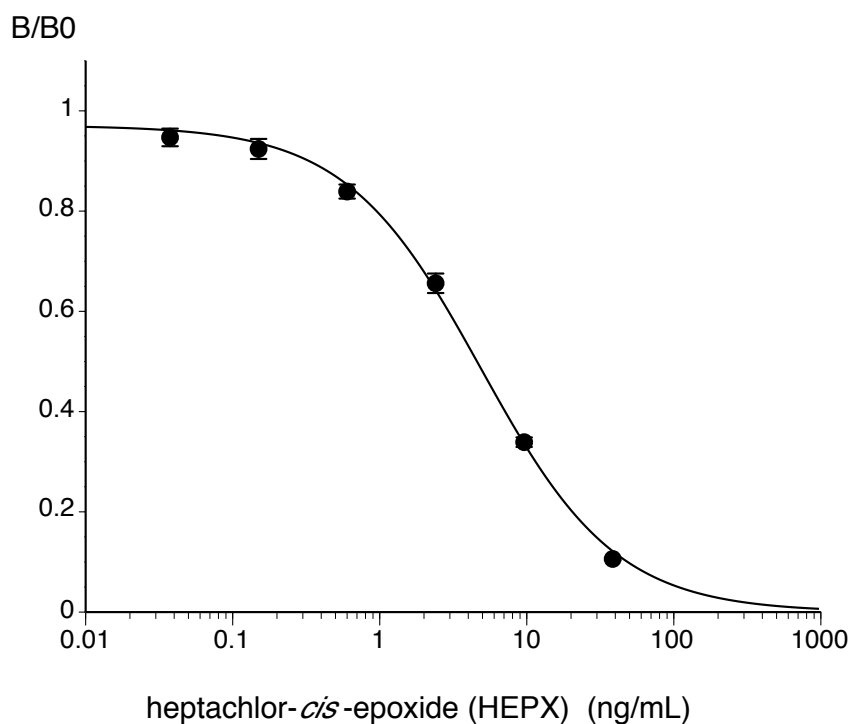
#### 3-3-1. ヘプタクロル類測定のための ic-ELISA の最適化

モノクローナル抗体 DrC-02 はヘプタクロル, および, HEPX に対しほぼ同等の特異性を有し<sup>45)</sup>, また土壌中において, ヘプタクロルはそのほとんどが HEPX に代謝されており主要な分析対象は HEPX であることから, ic-ELISA の標準品として HEPX を選択した.

ic-ELISA の検量線 (図. 14) から, HEPX 標準品の検出下限値は 0.34 ng/mL, 定量下限値は 1.08 ng/mL と算出された<sup>40)</sup>. また, 日差変動: 2.78~3.09 %, 日間変動: 1.49~3.70 %の CV 値を示し, 本 ic-ELISA は十分な測定精度を有していると判断された (表 8) .

本 ic-ELISA では反応容量 100  $\mu$ L 中 20  $\mu$ L の土壌試料を使用することから, 試料の初期濃度は ic-ELISA 値の 5 倍濃度として求められる. このため, ic-ELISA によって定量可能な土壌試料中のヘプタクロル量は, ic-ELISA の定量下限値である 1.08 ng/mL の 5 倍濃度である 5.4 ng/mL と計算された.

作付け前診断の判断指標となる土壌中のヘプタクロル類の残留量は, 土壌試料 1 g 中 5 ng (0.005 mg/Kg) をしきい値とする指針<sup>51)</sup>が策定されていることから, 指針の土壌残留量を判定するには ic-ELISA の定量下限値に鑑み, 少なくとも土壌 1g の粗抽出液を約 2 倍濃縮する必要があると考えられた.



\* 固相化ハプテン-タンパク質コンジュゲート : DrnC-OVA, 0.08 µg/mL (100 µL)

\* 使用抗体 : 酵素 (HRP) 標識 DrC-02 抗体, 0.04 µg/mL (80 µL)

\* 反応溶媒 : 5% DMSO -PBS

\* データ数 : n=5

図 14. ic-ELISA による HEPX の検量線

表 8. HEPX 測定用 ic-ELISA の測定精度の評価

	理論値(ng/mL/assay)	ic-ELISAの平均値 (ng/mL/assay)	CV (%)
日差変動	2.40	2.11	2.78
	9.60	9.44	3.09
日間変動	2.40	2.34	3.70
	9.60	9.39	1.49

\* 日差変動 : 同一試験内におけるバラツキ, データ数 n=3.

\* 日間変動 : 異なる 3 日間における n=3 のバラツキ.

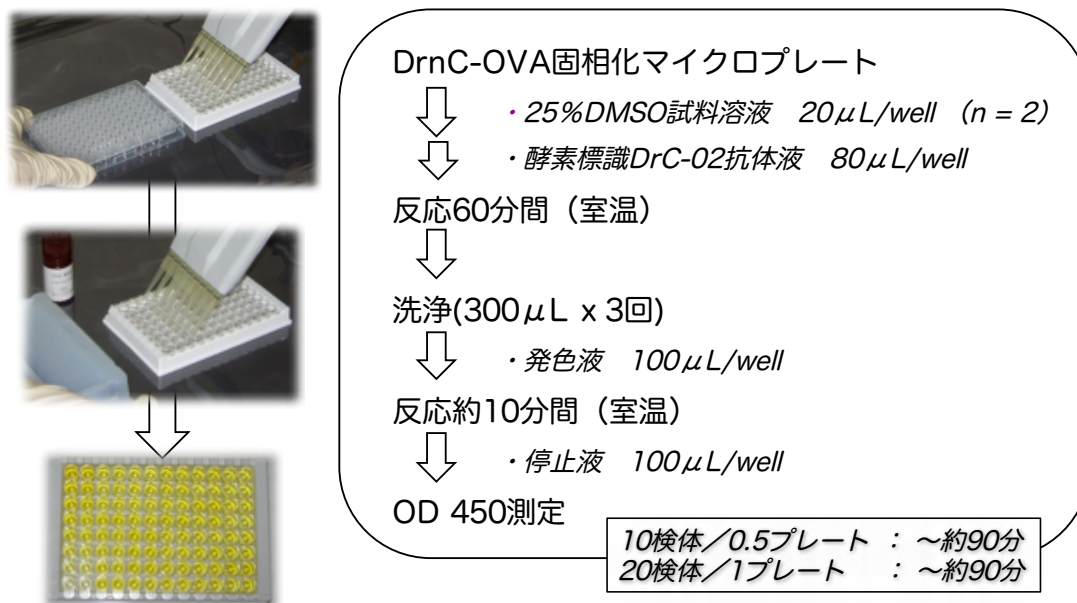
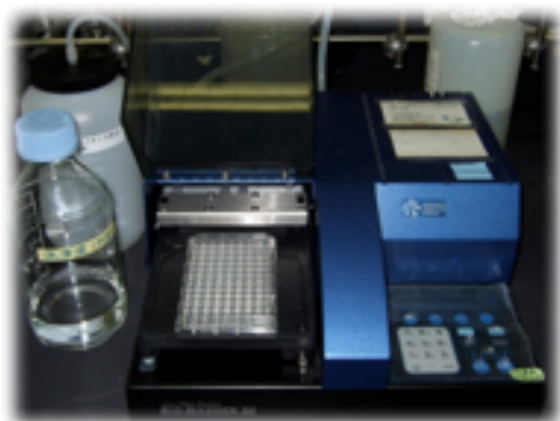


図 15. 構築した ic-ELISA の手順



(a)プレートウォッシャー (参考例)



(b)プレートリーダー (参考例)

図 16. ic-ELISA に必要な機器



### 3-3-2. グラファイトカーボン担体による吸脱着効果

グラファイトカーボン担体による HEPX の吸脱着効果を確認するため、土壌抽出溶媒である 50% (v/v)メタノール-水に 10 ng/mL になるように溶解した HEPX 標準品を用いて、3-2-3-1 項に記載した方法によりグラファイトカーボン担体溶出液を調製し、ic-ELISA に供した。表 9 に示すように、グラファイトカーボン担体からの HEPX (10 ng/mL/assay) の回収率は 108-113%の値を示し、吸脱着過程での損失なく回収されたものと考えられた。我々は、メタノールやアセトニトリルに溶解した HEPX はグラファイトカーボン担体に吸着せず、50% (v/v)メタノール-水をキャリアとした場合、HEPX がグラファイトカーボン担体へ吸着するという知見を得ているが、本研究により、吸着した HEPX をアセトニトリルによって容易に脱着でき損失なく回収できることを、新たに見出した。

この結果、グラファイトカーボン担体を利用して土壌抽出液中のヘプタクロル類を容易に濃縮できる事が明らかになり、ic-ELISA 用の簡便な試料濃縮法として活用できると考えられた。構築した ic-ELISA の HEPX の定量下限値から、土壌残留 HEPX のしきい値の分析を可能にするには、土壌 1g の粗抽出液を約 2 倍濃縮する必要があると判断されたが、グラファイトカーボン担体を利用した土壌抽出液中のヘプタクロル類の濃縮法により、この課題を解決することが可能となった。

表 9. グラファイトカーボンからの HEPX 標準品の回収率の検討

	Test # 1	Test # 2	Test # 3	Test # 4
<b>iC-ELISA 平均値 (ng/mL/assay)</b>	10.8	10.8	11.3	10.8
<b>回収率 (%)</b>	108	108	113	108
<b>CV (%)</b>	5.43	2.13	3.55	3.87

\* スパイクした HEPX 標準品量：10 ng/mL/assay

\* ic-ELISA のデータ数：n=3

### 3-3-3. グラファイトカーボン担体を用いた MSPD 法による精製効果

グラファイトカーボン担体を用いた MSPD 法による土壌抽出液の精製効果を評価するため、HEPX 標準品のスパイク試験を行った（表 10）。グラファイトカーボン担体溶出液の ic-ELISA 測定結果では、評価した 6 種類の土壌試料中 4 種類（土壌試料 A, B, E, F）において低値ながらもバックグラウンド値が認められた。4 種類の土壌試料では 2 ng/mL および 10 ng/mL のスパイク試料の回収率がいずれも 100%以上であり、特に 2 ng/mL のスパイク試料では回収率が 154–202%と大きな乖離を示した。これらの土壌試料についてスパイク試料の ic-ELISA 値からバックグラウンド値を差し引いた場合、回収率は 91.0–109%（2 ng/mL のスパイク試料）、90.8–109%（10 ng/mL のスパイク試料）と収束が見られた。バックグラウンド値が検出下限値以下であった土壌試料 C, D では理論値に対し比較的回収率の乖離が少ないことから、グラファイトカーボン担体精製画分には ic-ELISA への妨害物質が残存すると考えられた。一方、グラファイトカーボン担体の非吸着画分では、土壌試料 A および E のように高いバックグラウンド値を示す試料が見られた。また、バックグラウンド値を差し引いたスパイク試料の ic-ELISA 値において、土壌試料 A, C および F の様にそれぞれ 50.0%, 71.2%, 67.6%の低い回収率を示す試料が見られ、非吸着画分に ic-ELISA 値に負の影響を及ぼす妨害物質が存在する可能性が示唆された。グラファイトカーボン担体を用いた MSPD 法により、ic-ELISA 値に負の影響を及ぼす妨害物質の除去効果が期待されるが、定量測定に用いるにはさらなる精製が必要と考えられた。

表 10. グラファイトカーボンによる土壌抽出液の精製効果の評価  
(スパイクテスト)

			土壌 A	土壌 B	土壌 C	土壌 D	土壌 E	土壌 F
グラファイト カーボン からの溶出画分	バックグラウンド値 (ng/mL/assay)		1.85	1.12	nd	nd	1.52	2.08
	HEPXスパイク量 2 ng/mL/assay	平均値 (ng/mL/assay)	3.67	3.07	2.76	2.52	3.69	4.04
			<b>184 %</b>	<b>154 %</b>	<b>138 %</b>	<b>126 %</b>	<b>185 %</b>	<b>202%</b>
		Δ (ng/mL/assay)	1.82	1.95	2.76	2.52	2.17	1.96
			<b>91.0%</b>	<b>97.5 %</b>	<b>138 %</b>	<b>126 %</b>	<b>109 %</b>	<b>96.0 %</b>
	HEPXスパイク量 10 ng/mL/assay	平均値 (ng/mL/assay)	11.6	10.2	11.2	10.3	11.6	13.0
			<b>116 %</b>	<b>102 %</b>	<b>112 %</b>	<b>103 %</b>	<b>116 %</b>	<b>130 %</b>
		Δ (ng/mL/assay)	9.75	9.08	11.2	10.3	10.1	10.9
			<b>97.5 %</b>	<b>90.8 %</b>	<b>112 %</b>	<b>103 %</b>	<b>101 %</b>	<b>109 %</b>
グラファイト カーボン の 非吸着画分	バックグラウンド値 (ng/mL/assay )		28.8	nd	2.98	1.39	12.8	1.52
	HEPXスパイク量 10 ng /mL/assay	平均値 (ng/mL/assay)	33.8	9.67	10.1	11.6	21.9	8.28
			<b>335 %</b>	<b>97.0 %</b>	<b>101 %</b>	<b>116 %</b>	<b>219 %</b>	<b>82.8 %</b>
		Δ (ng/mL/assay)	5.00	9.67	7.12	10.2	9.10	6.76
			<b>50.0 %</b>	<b>96.7 %</b>	<b>71.2 %</b>	<b>102 %</b>	<b>91.0 %</b>	<b>67.6 %</b>

\* ic-ELISA のデータ数 : n=3,

\*  $\Delta$  (ng/mL/assay) : 平均値 (ng/mL/assay) - バックグラウンド値 (ng/mL/assay),

\* nd : 検出下限値以下.

\* 土壌試料: グラファイトカーボンを用いた MSPD 法にて精製した土壌抽出液 (GC-MS 分析の結果, ヘプタクロル類は検出されず) .

### 3-3-4. グラファイトカーボン／E-HyCu<sup>®</sup>担体を用いた MSPD 法による土壌抽出液の精製

グラファイトカーボン担体では除去しきれない ic-ELISA への妨害物質を除くことを目的に、高い吸着力と選択性を持つ担体である E-HyCu<sup>®</sup>担体との組み合わせによる精製効果を検討した。アセトニトリルによりグラファイトカーボン担体から溶出されたヘプタクロル類は、E-HyCu<sup>®</sup>担体の非吸着画分に溶出される。土壌由来のマトリクス存在下、HEPX の E-HyCu<sup>®</sup>担体からの回収率を確認したところ、98.0-105%の値を得ることができ（表.11）、アセトニトリル溶媒中、HEPX は損失なく E-HyCu<sup>®</sup>担体を通過すること、および、グラファイトカーボン担体で除去しきれない土壌中マトリクスに対し、E-HyCu<sup>®</sup>担体は有効な除去効果を有すると考えられた。

表 11. 土壌中マトリクス存在下における E-HyCu<sup>®</sup> よりの HEPX の回収率

	Test # 1	Test # 2
ic-ELISA 平均値 (ng/mL/assay)	10.5	9.80
回収率 (%)	105	98.0
CV (%)	2.61	3.38

\* 土壌中マトリクス：土壌抽出液のグラファイトカーボン溶出画分.

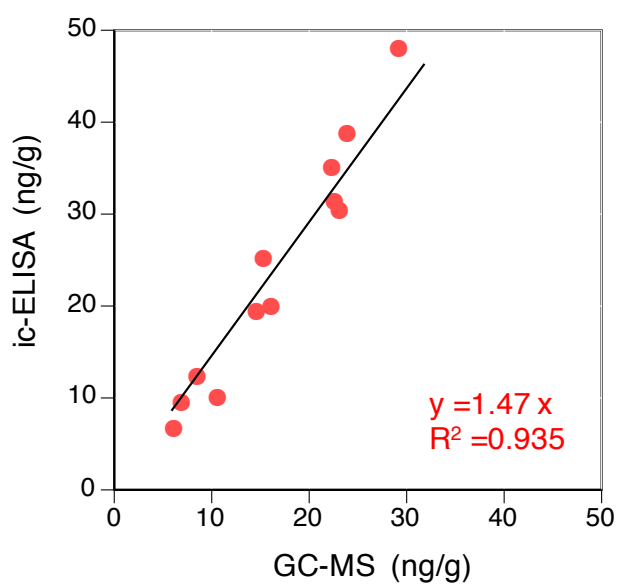
\* スパイクした HEPX 標準品量：10ng/mL/assay.

\* ic-ELISA のデータ数：n=3.

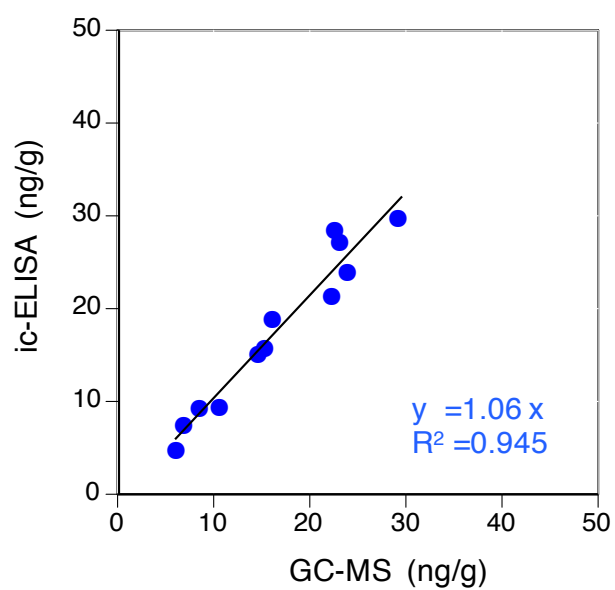
### 3-3-5. MSPD 法により精製した土壌抽出液の評価結果

供試土壌抽出液 12 試料をそれぞれ、グラファイトカーボン担体のみ、或いは、グラファイトカーボン／E-HyCu<sup>®</sup>担体を用いた MSPD 法により試料調製を行なったのち、ic-ELISA にて測定した結果を GC-MS 分析値と比較した(図 17)．グラファイトカーボン担体のみでは GC-MS 分析値との乖離が見られる土壌試料においても、グラファイトカーボン／E-HyCu<sup>®</sup>担体を組み合わせた MSPD 法による試料調製を行うことによって、GC-MS 分析値と近似したヘプタクロル類分析値を得ることができた．GC-MS 分析値との乖離が見られる試料もあることから課題は残るものの、ic-ELISA に対する妨害物質の除去効果が大きく効果的な方法であると考えられた．

環境試料中に存在する免疫測定法の妨害物質としてフミン質が挙げられる<sup>52)</sup>．我々は、土壌試料中の色素も ic-ELISA への妨害影響を示し、イオン交換担体や C18 担体ではこれら妨害物質の低減が不十分であるとの知見を得ている．細孔を有し比表面積と粒子径を制御した活性炭にケイ素酸化物を被覆し、アミノ基含有ケイ素化合物を化学修飾したハイブリッド材料である E-HyCu<sup>®</sup>は、マトリクスに合わせた活性炭の吸着性能とアミノ基含有ケイ素化合物を介した相互作用による高いマトリクス除去効果を有し<sup>53)</sup>、脂肪酸や油脂などの有機物や色素類についても除去効果が報告されている<sup>54)</sup>．このことから、土壌試料中のフミン質などの有機物や色素類が除去され、ic-ELISA に対する妨害影響の低減効果が得られたものと考えられた．MSPD 法を用いる本法は、土壌抽出液中のヘプタクロル類の濃縮効果と効率的な妨害物質去効果を有する迅速簡便な土壌試料調製法であり、多検体迅速分析が求められるヘプタクロル類測定用 ic-ELISA に適した試料調製方法と考えられた．



グラファイトカーボン処理のみ



グラファイトカーボンおよび  
E-HyCu<sup>®</sup>処理

図 17. MSPD 法により精製した土壌抽出液の評価結果

## 第4章 免疫測定法による土壤残留ヘプタクロル類分析法の開発

### 4-1. はじめに

構築したグラファイトカーボン／E-HyCu<sup>®</sup>担体を用いた MSPD 法による土壤抽出液前処理法とヘプタクロル類測定用 ic-ELISA より成る土壤残留ヘプタクロル類分析法の有効性を評価するため、圃場より採取された土壤試料の分析を行い、リファレンス法である GC-MS 分析値と比較検討した。

### 4-2. 材料および方法

#### 4-2-1. 圃場より採取した土壤試料の調製

「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業、安全・安心なかぼちゃ生産に向けた土壤残留ヘプタクロル類診断技術の開発 (26074C)」研究より供出された灰色低地土および黒ボク土を、土壤試料として使用した。供試土壤 60 検体は過去の出荷前検査において、カボチャから残留基準値を超えるヘプタクロル類が検出された圃場 60 種類より採取された試料である。

Sakai らの報告<sup>41)</sup>に準じて、土壤 8 g (乾燥重量) を 40 mL (固液比 1 : 5) の 50% (v/v) メタノール-水に懸濁して 25℃下 24 時間往復振とうののち遠心分離 (3000 rpm, 10 分間) を行い、上清を土壤抽出液として回収した。

#### 4-2-2. 機器分析値 (GC-MS) との相関

グラファイトカーボン／E-HyCu<sup>®</sup>担体を用いた MSPD 法により土壤抽出液を精製し、得られた溶出液をエバポレーターで濃縮乾固した。0.125 mL の DMSO を加えて溶解させたのち、水 0.375 mL を混合して 25% (v/v) DMSO 溶液を調製し、この試料を ic-ELISA の測定試料とした。

50% (v/v) メタノール-水による 24 時間振とう抽出ののち、グラファイトカーボン／E-HyCu<sup>®</sup>担体を用いた MSPD 法により試料調製を行った供試土壤 60 検体について、調製試料中のヘプタクロル類を ic-ELISA にて分析した結果を同一土壤の GC-MS 分析値と比較検討した。

土壤試料の GC-MS 分析値は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業、安全・安心なかぼちゃ生産に向けた土壤残留ヘプタクロル類診断技術の開発 (26074C)」より提供された分析値を用いた。提供された GC-MS 分析値の分析条件は表 12 の通りである。

表 12. 供試土壌の GC-MS 分析条件

---

測定機器：HP6890-5975N, Agilent Technologies.

注入口温度：250℃，キャリアガス制御：ヘリウム（流量 1 mL min<sup>-1</sup>）.

インターフェイス温度：280℃，イオン源温度：250℃，

四重極温度：150℃カラム：ENV-8（0.25 mm×30 m, 0.25 μm）.

昇温条件：120℃，10℃min<sup>-1</sup> →180℃，5℃min<sup>-1</sup>→300℃（10 min.）

測定イオン：ヘプタクロル（372.374 m/z<sup>1</sup>），HEPX（355.357 m/z<sup>1</sup>）.

---

＊「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業，安全・安心なかぼちゃ生産に向けた土壌残留ヘプタクロル類診断技術の開発（26074C）」より提供.

#### 4-3. 結果および考察

60 種類の供試土壌試料を ic-ELISA と GC-MS により分析を行った結果，GC-MS 分析により検出下限値以下であった 34 検体は ic-ELISA においても検出下限値以下の結果を得，ic-ELISA における偽陽性は認められなかった．分析値が得られた 26 検体について GC-MS と ic-ELISA の分析値をプロットしたところ，GC-MS 分析値に近似した値が得られ，良好な相関関係（R<sup>2</sup> =0.966）を得ることができた（図 18）．

以上の結果から，グラファイトカーボン／E-HyCu<sup>®</sup>担体を用いた法による土壌抽出液前処理法は，土壌残留ヘプタクロル類の ic-ELISA の前処理方法として有用であることが明らかになった．

本法は，ヘプタクロル類残留基準値超過リスクの低減に資するものと考えられ，同じく，キュウリ等のウリ科作物への蓄積が問題となっているディルドリンやアルドリン等のドリ剤に対し，作付け前土壌の ic-ELISA 分析用の土壌試料調製法としての応用が期待される．また，DDT (dichloro-diphenyl-trichloroethan) 等の他の POPs 汚染が疑われる土壌のモニタリングのための，有効な ic-ELISA 分析用土壌試料調製法となる可能性が期待される．



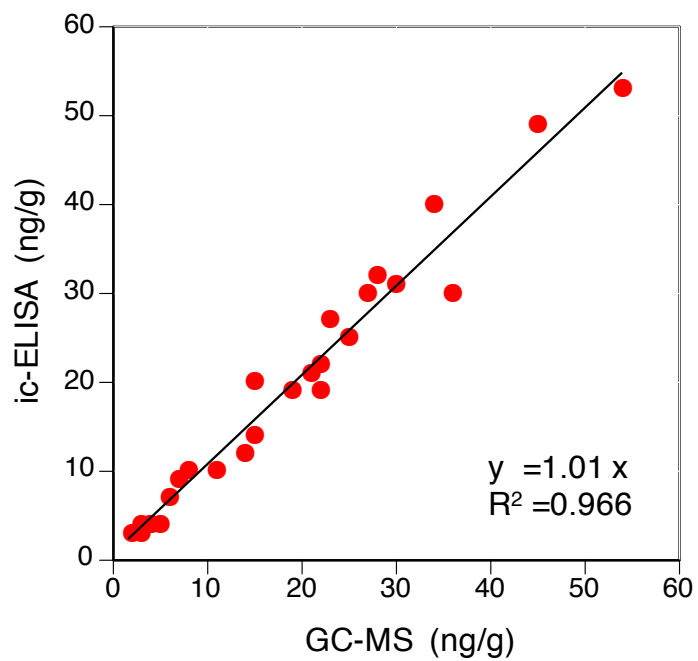


図 18. 土壤試料分析結果～ ic-ELISA 値と GC-MS 値の比較～

## 第5章 Lab-on-a-CD への免疫測定法の応用

### 5-1. はじめに

Lab-on-a-Chip や  $\mu$ TAS (Micro Total Analysis Systems) と呼ばれるマイクロ流体デバイスは MEMS (Microelectromechanical Systems) などの微細加工技術を利用し、チップ上に微小流路や送液部、検出部などを集積した小型の化学、生化学分析統合システムのことである。分析試料量が微量であり、小型化が可能で持ち運びが可能、オン・サイト分析、短時間分析が可能とされ、バイオセンサやケミカルセンサとしての実用化が期待される技術である<sup>55)~57)</sup>。

医療の質の向上、患者の時間的・精神的負担の軽減等の効果への期待から POCT (Point of Care Testing) 技術が導入されてきた医療現場においても、医療法改正等に伴い、POCT のニーズが高まりをみせている。医薬品開発における標的タンパク質分子の同定や、リード化合物のスクリーニング等にハイスループットスクリーニングが必要とされ、Lab-on-a-Chip 技術を応用するプラットフォームが登場しており<sup>58)~60)</sup>、また、マイクロ流体デバイス技術を応用した細胞アッセイツールとして Organ-on-a-chip の概念が提唱され、世界的に研究開発が進む<sup>61)~62)</sup> など、Lab-on-a-Chip 技術は医療、医薬品開発分野を中心に様々な分野で応用されつつある。

Lab-on-a-Chip では反応の飛躍的高速化や効率化、検体や試薬の少量化が期待されるが、一方で、マイクロ流路内での攪拌や反応に一定の流路長が必要となるため集積化に限界があること、また複雑な化学操作では連続的なフローが困難である等の課題が挙げられる。この課題に対し、平面構造であるマイクロ分析ディスクを積層して接合した複数層の流路の相互連結による3次元流路ネットワーク構造が報告されている<sup>63)</sup>。

兵庫県立大学、内海研では垂直方向に単位化学操作を実行する垂直リアクターを提案しており、この垂直リアクターは反応場を垂直化できれば比表面積を大幅に増やせるのみならず、送液時の圧力損失も低減可能となり滴量も同時に行うことができる。さらに、この垂直リアクターを反応場と共に2次元流路の垂直方向の接続点とし、異なる機能のマイクロ分析ディスクを複数積層した微小流路や反応容器を compact disc 上に作成した3次元積層デバイスである3次元 Lab-on-a-CD を提案し、その有効性を実証してきた<sup>64)~65)</sup>。3次元 Lab-on-a-CD は3次元空間を用いた効率的なミキシングや、3次元微細構造に基づく反応場面積の増大などの特徴を有し、反応の高速化や高感度化が期待される。ま

た、多種類の機能をフレキシブルに集積できることから、複雑なフルプロトコルの実現が可能である。内海研では、3次元 Lab-on-a-CD の免疫測定分野への応用も進めており、低分子の環境負荷物質や、機能性タンパク質の測定にも成功している<sup>66)~67)</sup>。よって本研究では、実績のある内海研のデバイスを免疫測定法用のデバイスとして検討を進めることとした。

Lab-on-a-CD 上で免疫測定を行うにあたり、より高感度な系の検討を行うため、モデルとなる免疫反応系としてサンドイッチ酵素免疫測定法 (enzyme-linked immunosorbent assay : ELISA) を採用し、免疫反応場への 1 次抗体の集積化方法について検討を行った。マイクロタイタープレートやビーズを反応場として用いる従来の ELISA においては、物理化学的吸着法を用いて反応場への抗体の固定化が行われる場合が多い。物理化学的吸着法は非特異的反応をあまり起こさず、沢山の抗体を簡便に固定化できる実績のある固定化法であるが、この場合の免疫反応場は、抗体が物理化学吸着し易いように電荷状態を制御したポリスチレン材料である場合が一般的である。一方、Lab-on-a-CD では、polydimethylsiloxane (PDMS) や poly-methylmethacrylate (PMMA) などの材料が免疫反応場となるため、物理化学的吸着法では十分量の抗体固定化が困難である事が予想される。また、反応場が微小化されることによる免疫測定法の感度低下を防ぐためにも、機能が保持された抗体分子を一定の配向を持って反応場の基板表面に集積化させることが、抗体固定化基板作製の上で重要な要素技術となると考えられる。このため、本研究では、内海研で作製されたアミノ基修飾基板 (塩素基を有する基板を合成したのち塩素基をアミノ基に置換した基板) に対し、ビオチン-ストレプトアビジン結合による累積層の形成<sup>68)~70)</sup> を作製し、このビオチン-ストレプトアビジン累積層に対し、ビオチン修飾 1 次抗体を結合させ 1 次抗体累積層を形成させる戦略により抗体分子の集積化を図り、Lab-on-a-CD 上での高感度な免疫測定法構築の可能性を検討した。

## 5-2. Lab-on-a-CD の構成

免疫測定法を応用するデバイスとして、内海研にて実績のある 3 次元 Lab-on-a-CD を使用した。3 次元 Lab-on-a-CD は LIGA (Lithographie, Galvanoformung, Abformung) process で作製する精密微細構造体である CD 型  $\mu$ TAS の積層と接合による 3 次元流路のネットワーク化を特徴としており、微細加工された PMMA の垂直流路と PDMS の平面流路を無接着剤接合により接合し、3 次元流路ネットワークを有するデバイスを作製する。リソグラフィーには X 線ディープリソグラフィーを用い、ニュースバル放射光施設（兵庫県立大学、高度産業科学技術研究所）のビームライン BL02 が使用されている。

内海研の 3 次元 Lab-on-a-CD の特徴を以下に示した。

血球分離や試料精製などの前処理槽、バッファーなどの試薬蓄積槽を異なる層に実装し反応場有する層を積層する、すなわち、機能を持った層の積層によって垂直方向への機能の積み上げが容易となり、多くの機能を高密度に集積化することが可能である。積層構造にすることで各試薬蓄積槽（リザーバー）をより深くできることからリザーバーの平面方向面積が減少し、平面方向の集積度の向上によるフレキシブルな流路設計を行うことができる。検出槽をより深くすることで平面構造 Lab-on-a-Chip では実現が困難だった長い光路長を実現することができ、高い S/N 比を持つ光学検出系の構築が可能となる<sup>64)</sup>。また、3 次元構造を取ることで、キャピラリーバンドル構造のマイクロフィルタを垂直型流路として Lab-on-a-CD に組み込むことができる。キャピラリーバンドル構造は液体の表面張力を利用して液体を保持し、垂直方向のバルブとして利用できることから、より柔軟な流路設計が可能となり、試薬の送液において平面流路には無い 3 次元構造特有の流体挙動を起こすことから、混合効率が非常に高くなる。さらに、キャピラリーバンドル構造は大表面積を有しており、側壁を化学反応の担体として利用することで少ない試薬量で高速、高感度分析が可能になると考えられる<sup>65)</sup>。Lab-on-a-CD 上で免疫反応を行う際、キャピラリーバンドル構造を有する 3 次元流路を反応槽とし、ディスクの回転による遠心力によって試薬類の送液を行い、垂直、および、平面方向のキャピラリーバルブにより送液制御を行う。

図 19 に 3 次元 Lab-on-a-CD の概念図を、図 20 にデバイスの概略図を示した。

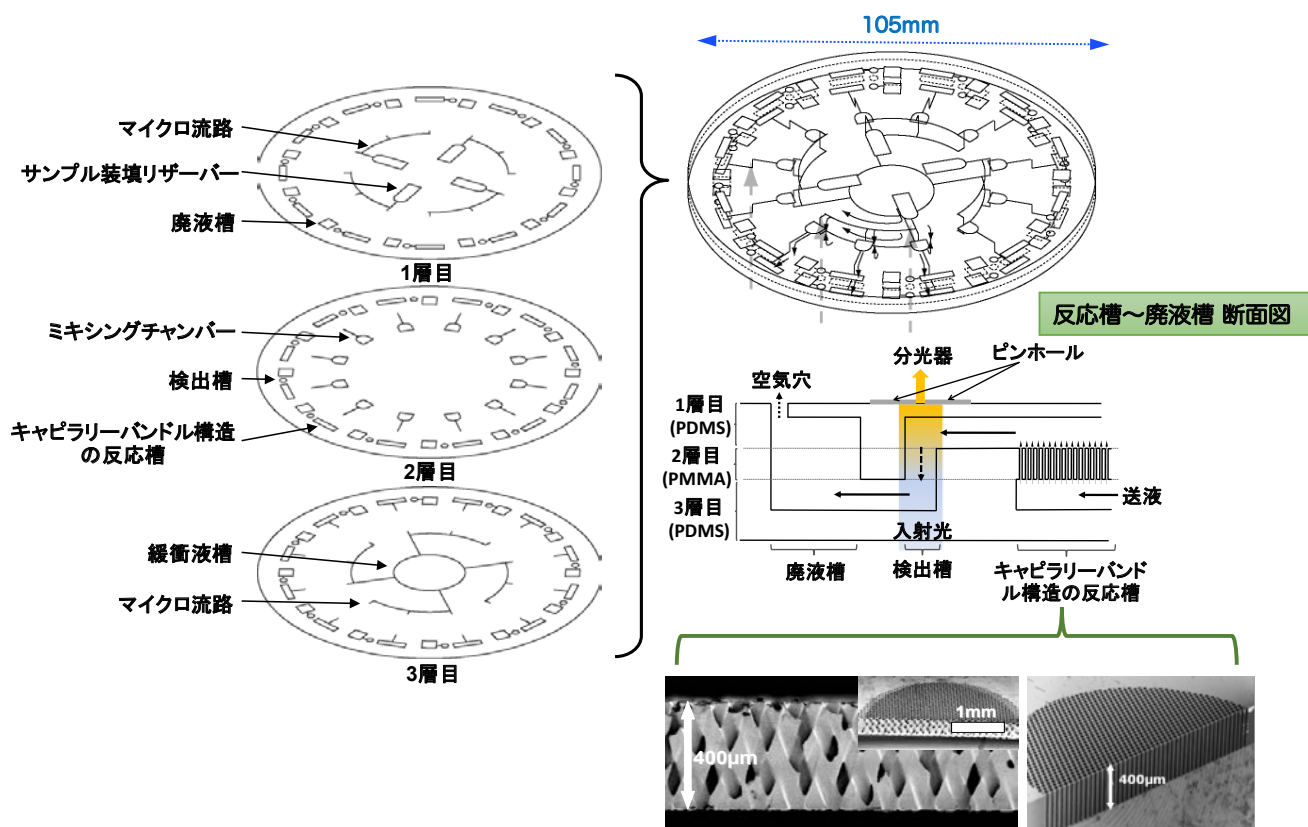


図 19. 3次元 Lab-on-a-CD のコンセプト

図 20 はサンドイッチ ELISA を実行するため、内海研にて設計されたデバイスの概略図である。本デバイスは 10 検体分析用として設計されており、三次元流路部にて免疫反応を行う。

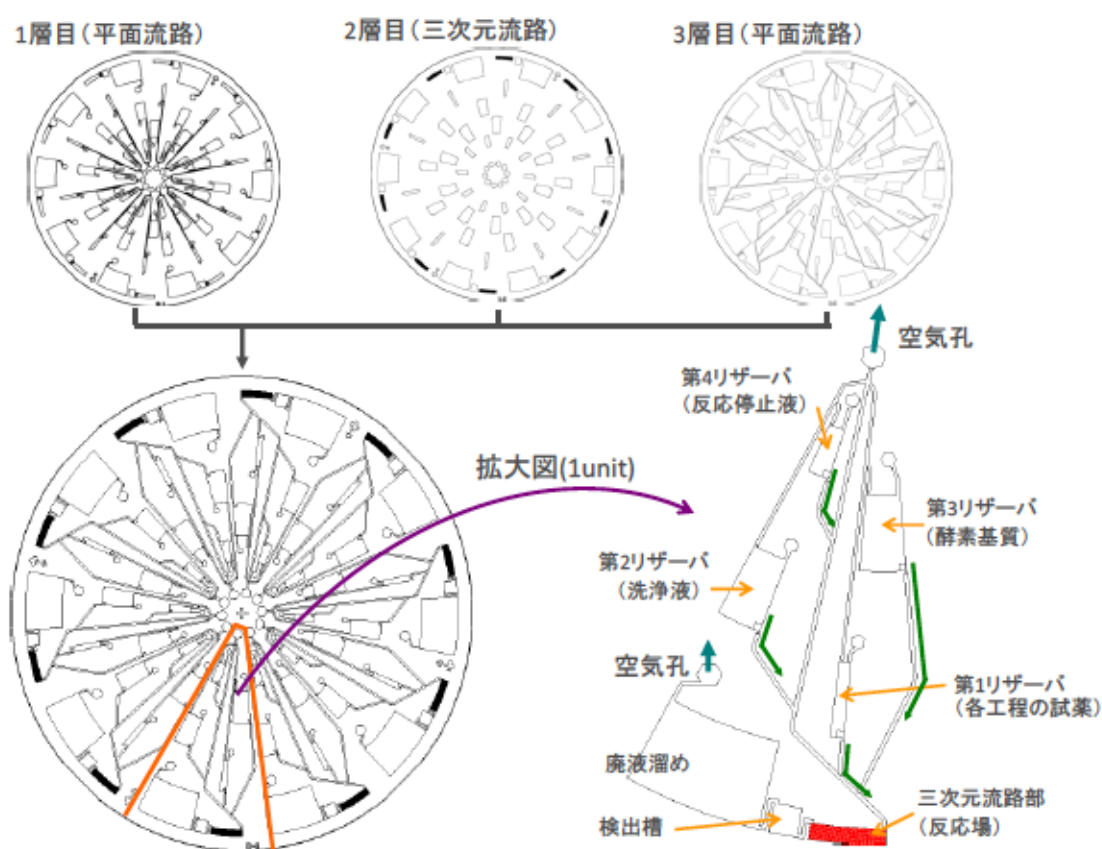
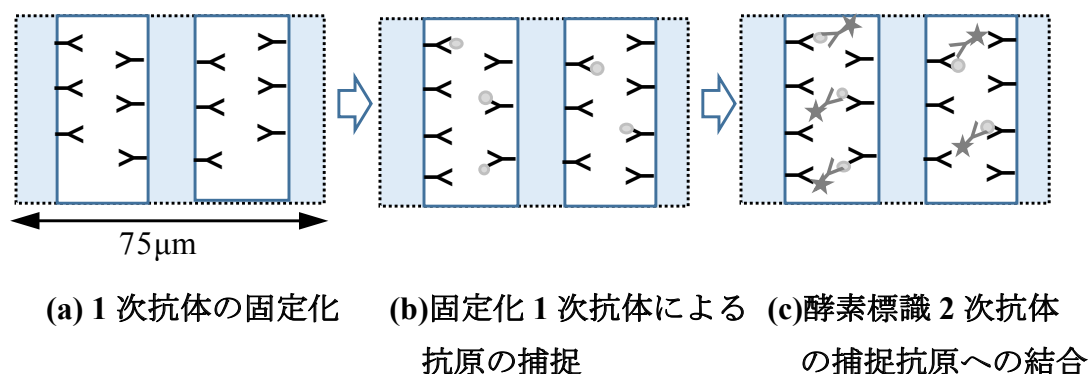


図 20. 免疫測定を行うデバイスの概略

図 21 に 3 次元 Lab-on-a-CD のキャピラリーバンドル構造の反応槽内で行われるサンドイッチ ELISA のスキームを示した。サンドイッチ ELISA では抗原特異的な 2 種類の抗体により，抗原（測定対象物質）をサンドイッチする反応形式をとる。このため，1 次抗体が反応場に固定化されていることが必要となる。次に，固定化された 1 次抗体に測定対象物質が捕捉される。最後に，酵素標識された 2 次抗体が 1 次抗体に捕捉された測定対象物質に結合する。2 次抗体に導入された酵素活性を測定することによって，測定対象物質濃度が求められるため，ic-ELISA とは反対に，測定対象物質濃度が高いとサンドイッチ ELISA の測定値は高くなる。1 次抗体による分析対象物質捕捉のステップにより，夾雑物質との交差反応が排除され，特異性が高く高感度測定に有利な方法である。



Y : 1 次抗体    • : 抗原（分析対象物）   ★ : 酵素標識 2 次抗体

図 21. キャピラリーバンドル構造の反応槽内でのサンドイッチ ELISA

### 5-3. 官能基導入基板へのビオチン-ストレプトアビジン累積層作製の検討

#### 5-3-1. 官能基導入基板の概略

内海研にて検討された官能基導入基板の概略について示した。

機能性生体高分子である抗体分子との間に共有結合を形成する場合，高反応性の第一級アミンが存在することが望ましい．反応場を含む垂直流路材料となる PMMA に直接アミノ基を導入するのは困難であることから，以下のような戦略を取った．

PMMA と側鎖に塩素基をもつ 2-chloroethyl methacrylate (CEMA) をランダムに共重合することにより，塩素基を有する P(MMA/CEMA)を合成する．さらに，P(MMA/CEMA)上の塩素基に対し polyethyleneimine (PEI) (30 w t %溶液) を反応させることによって，塩素基と PEI 中のアミンとの置換反応<sup>71)</sup>により P(MMA/CEMA)にアミンを導入する．PEI は 1 級～3 級アミンを含む分岐構造を有するポリマーであることから，P(MMA/CEMA)への高反応性のアミンの導入が期待される．

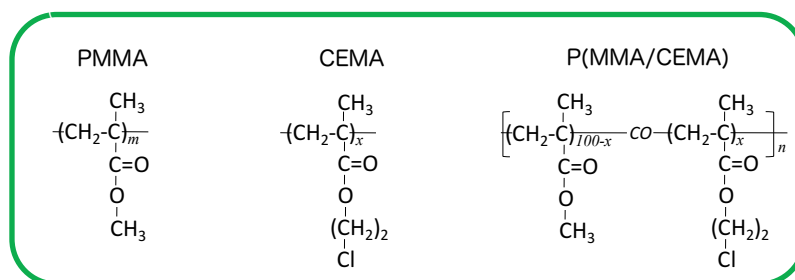


図 22. P(MMA/CEMA)およびその構成モノマーの構造

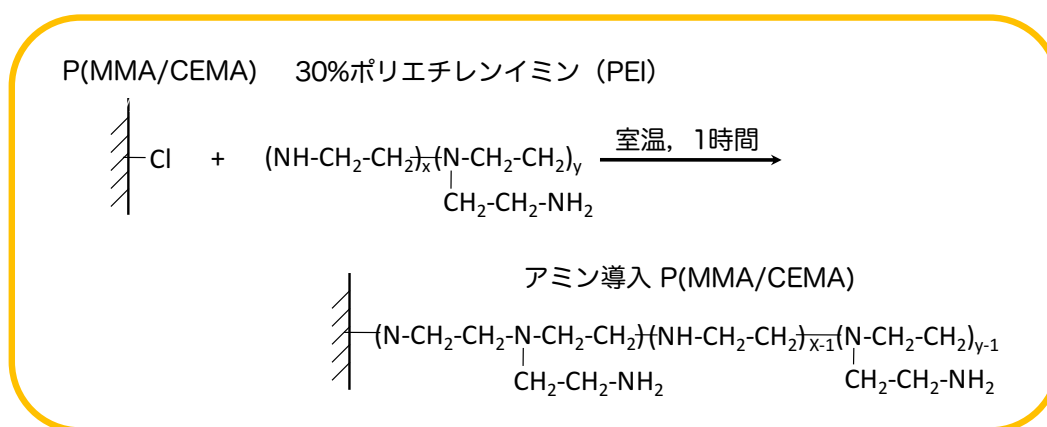


図 23. P(MMA/CEMA)上の塩素基のアミンによる置換反応のスキーム



### 導入された官能基の分析

分析には X 線光電子分光(XPS: X-ray Photoelectron Spectroscopy)を使用した。なお、X 線管は一般的に使用されており、広いエネルギー範囲でかつ高分解能で測定を行うことができる  $\text{MgK}_\alpha$  を使用した。

合成した各基板の XPS によるワイドレンジスキャンの結果を図 24-(a)に示した。スペクトルは C1s 光電子ピーク (962.4 eV) のピーク高さと規格化した。未処理の P(MMA/CEMA)基板、PEI 処理後の P(MMA/CEMA)基板では、いずれも PMMA に由来すると考えられる C1s 光電子ピークや O1s 光電子ピークを確認することができた。PEI 処理を行った P(MMA/CEMA)基板では N1s 光電子ピークが確認されており、PEI 処理によりアミンが導入されたものと考えられた。図 24-(b)は、Cl2p 光電子ピーク (C1s 光電子ピークのピーク高さと規格化)、図 24-(c)は N1s 光電子ピーク (C1s 光電子ピークのピーク高さと規格化)を抽出したものである。Cl2p 光電子ピークは PMMA では検出されず合成した P(MMA/CEMA)基板においてのみ検出されており、合成基板に塩素基が導入されたことを確認した。また、N1s 光電子ピークは、PEI 処理後の P(MMA/CEMA)基板にのみ検出され、PMMA、および未処理 P(MMA/CEMA)基板には検出されないことから、PEI 処理により P(MMA/CEMA)基板に特異的にアミンを導入することができたものと判断した。PEI 処理 (分子量(M.W.): 1800 および 10000, (30 wt %溶液)) については、処理時間を 1 時間、12 時間、30 時間まで延長したが、反応時間と N1s 光電子ピーク強度との間に有意な差は認められなかった。PEI 処理による基板へのアミン導入は反応場への抗体の集積化や配向制御における重要な技術の一つであることから、今後、反応条件の最適化等、基板へのより適切なアミン導入条件を決定することが必要と考えられた。

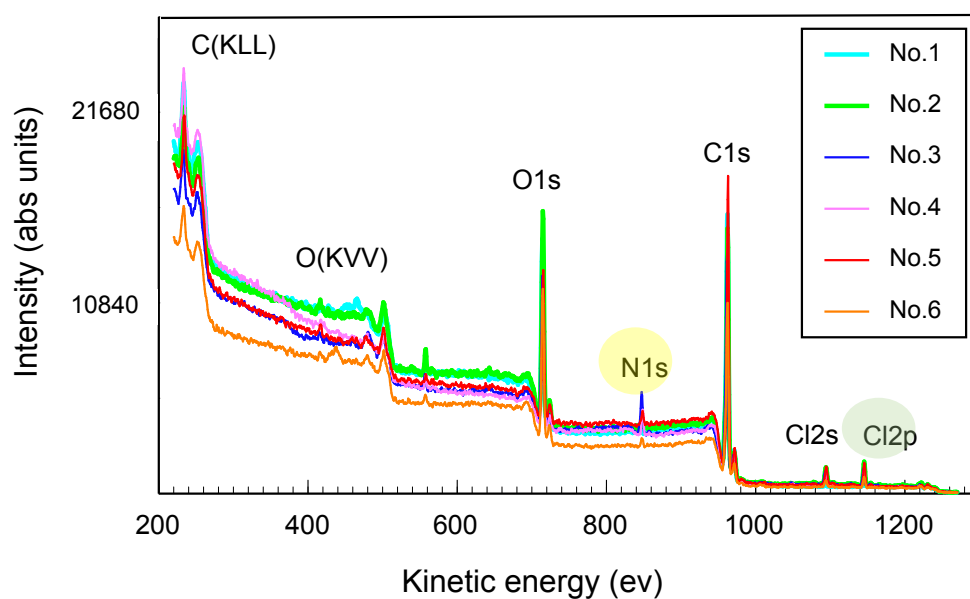


図 24-(a). XPS によるワイドレンジスキャン

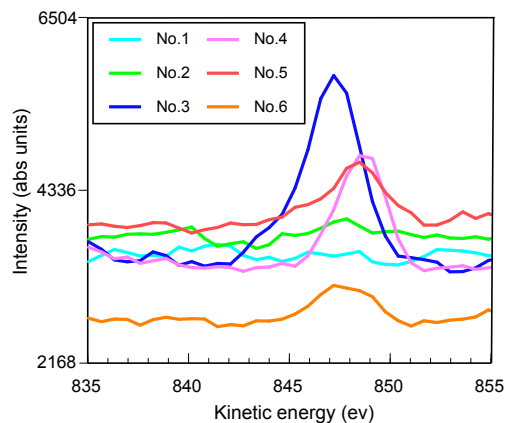


図 24-(b). Cl2p 光電子ピーク

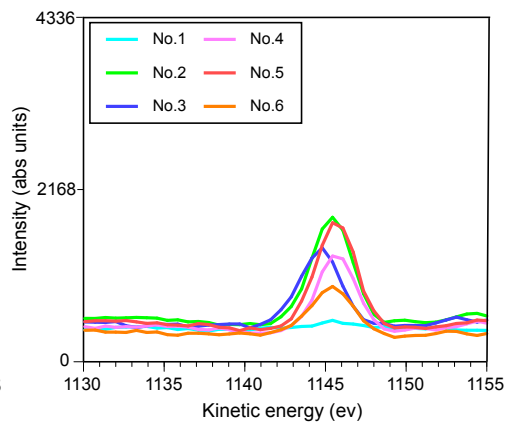
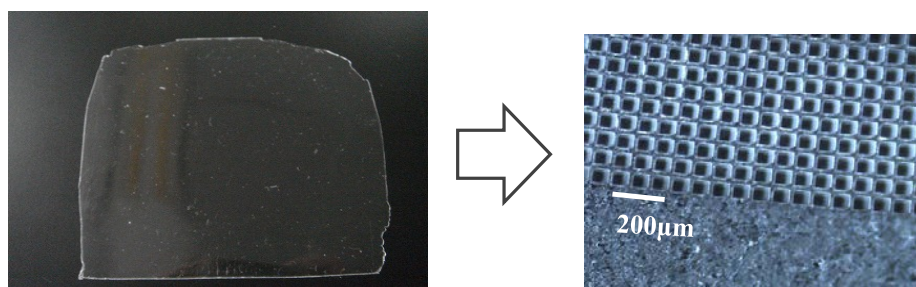


図 24-(c). N1s 光電子ピーク

No.1: PMMA  
 No.2: P(MMA/CEMA)  
 No.3: P(MMA/CEMA), PEI (M.W., 10000) 1hr.処理  
 No.4: P(MMA/CEMA), PEI (M.W., 10000) 12hr.処理  
 No.5: P(MMA/CEMA), PEI (M.W., 10000) 30hr.処理  
 No.6: P(MMA/CEMA), PEI (M.W., 1800) 1hr.処理

### P(MMA/CEMA) の微細加工

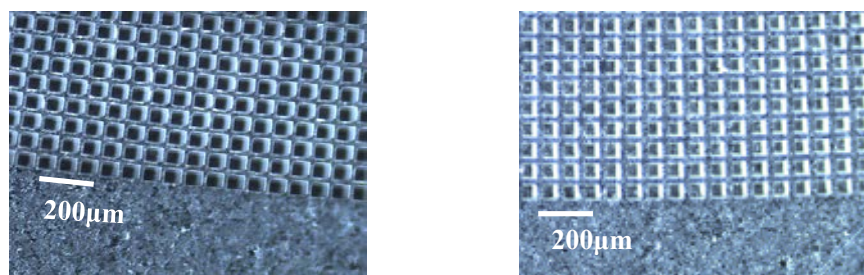
作製した塩素基導入基板 P(MMA/CEMA)を集積化三次元マイクロ分析ディスクに組み込むには貫通孔の加工が必須となるため、内海研にて X 線リソグラフィーにて P(MMA/CEMA)の微細貫通孔加工を行った (図 25) . PMMA, および, P(MMA/CEMA)を加工した微細構造体の光学顕微鏡写真に示すように, 塩素導入基板である P(MMA/CEMA)は、PMMA と同じく X 線リソグラフィーによる微細構造体の加工が可能であることが確認され (図 26) , 3 次元 Lab-on-a-CD の反応場として活用できることが示された.



(a) P(MMA/CEMA)ポリマー

(b)微細構造帯加工後

図 25. P(MMA/CEMA)ポリマーの X 線リソグラフィーによる微細構造体加工



(a) PMMA

(b)P(MMA/CEMA)

図 26. 微細構造体の光学顕微鏡写真  
(PMMA と P(MMA/CEMA)の比較)

### 5-3-2. 塩素基導入基板 P(MMA/CEMA)を利用した抗体集積化の戦略

塩素基を有する P(MMA/CEMA)基板に対し PEI を作用させアミノ基を導入させる。次にアミノ基に対し、活性エステル基を有するビオチン誘導体を反応させることによって、定量的にビオチンを導入する。さらに、導入されたビオチンに対しストレプトアビジンを特異的に結合させ、ビオチン-ストレプトアビジン膜を形成させ、抗体固定化用基板とする。次に、ビオチン標識 1 次抗体を抗体固定化用基板に反応させ、ストレプトアビジン層に特異的に結合させる。アビジン 1 分子に対しビオチン 4 分子が結合することから、ストレプトアビジンを介しビオチン標識 1 次抗体を集積化することができる。官能基導入基板を用いることで抗体固定化反応の制御が可能となり、ビオチン-ストレプトアビジン膜の利用によって抗体分子の固定化量の増加が期待される。また、共有結合形成等の化学反応に抗体分子を直接用いることを回避でき、抗体機能の低下を抑制することが可能となる。

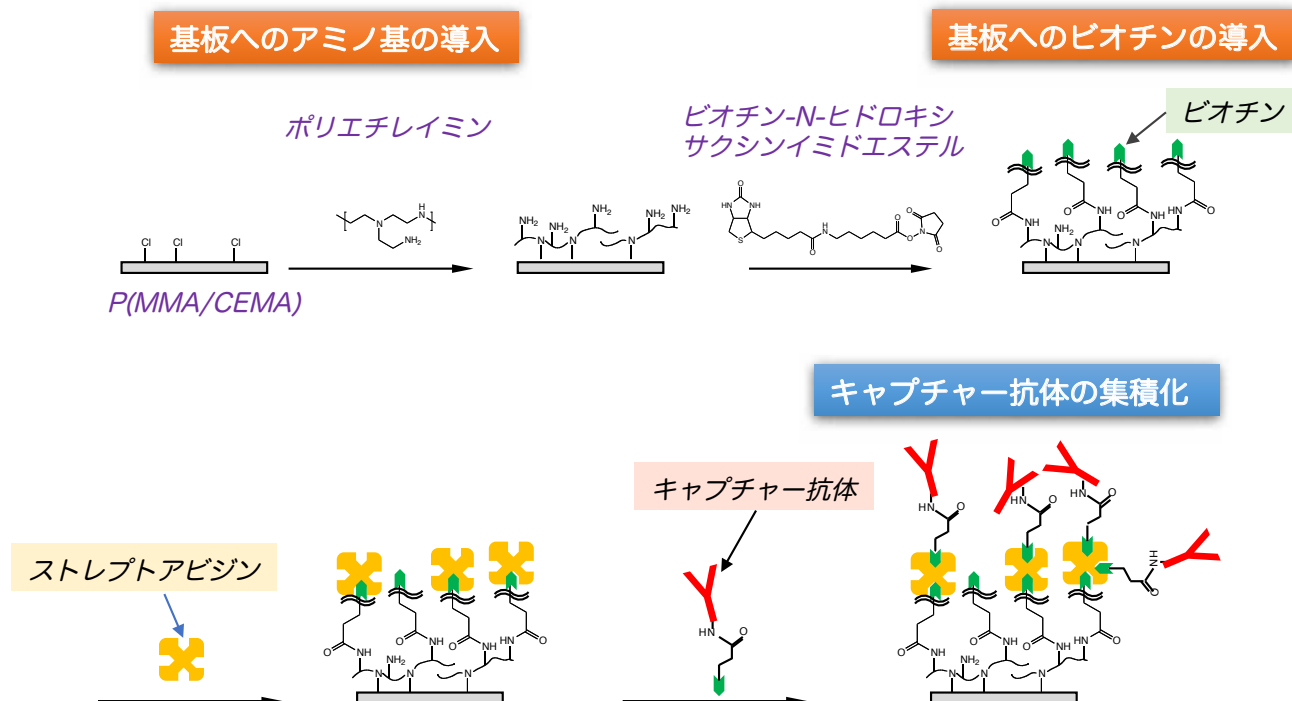


図 27. 塩素基導入基板 P(MMA/CEMA)を利用した 1 次抗体集積化のスキーム

### 5-3-3. アミノ基導入基板への機能性タンパク質の結合評価

#### 5-3-3-1. 実験方法

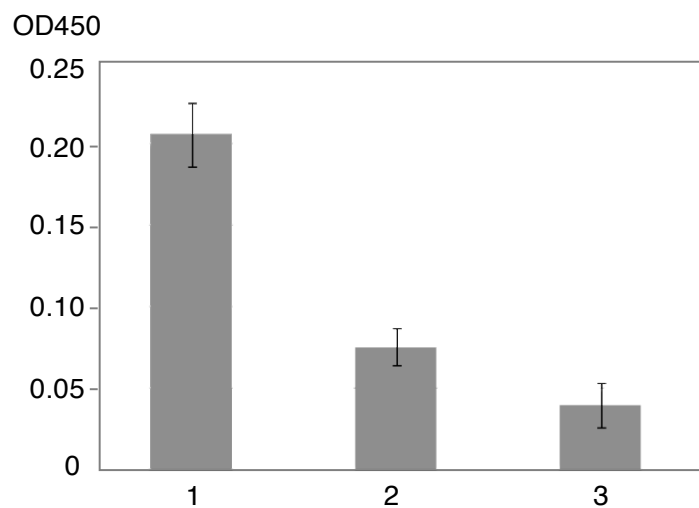
作製したアミノ基導入 P(MMA/CEMA)基板の評価を行うため、基板上でのビオチン-ストレプトアビジン結合の形成能を検討した。

アミノ基導入 P(MMA/CEMA)に第 1 級アミンとの反応性を有する biotin N-hydroxy-succinimide ester (100  $\mu$ g/ml) を作用させてビオチンを導入した。次に、ビオチンに対し特異的な反応性を有する酵素 (Horseradish peroxidase : HRP) 標識ストレプトアビジン (100  $\mu$ g/ml) を作用させ、基板へストレプトアビジンを導入させた。非特異的結合を抑制するため、各反応工程終了後に 0.05% tween 20 含有 PBS にて、数回、基板を洗浄する洗浄工程を設けた。

標識剤である HRP の発色基質 (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine : TMB) を用いて酵素活性を測定することにより、HRP 標識ストレプトアビジンの基板への結合能を評価した。

#### 5-3-3-2. 結果および考察

図 28 に示すように、PEI 処理によりアミンを導入した P(MMA/CEMA) において有意な HRP 活性が検出され、HRP 標識ストレプトアビジンの固定化が確認された一方、アミンが導入されていない P(MMA/CEMA)では HRP 活性は低値を示した。PEI 未処理の基板に biotin N-hydroxysuccinimide ester を作用させた場合にバックグラウンドに比べて若干の吸光度の上昇が観察されたことから、biotin N-hydroxy- succinimide ester の非特異的吸着の影響が存在する可能性が示されたが、アミン導入 P(MMA/CEMA)における HRP 活性は特異的なストレプトアビジンの結合であると考えられ、ビオチン-ストレプトアビジン結合を介したタンパク質分子の固定化におけるアミン導入基板の有用性が確認されたものと判断した。



No. 1 : P(MMA/CEMA), PEI 処理 + biotin N-hydroxysuccinimide ester 処理

No. 2 : P(MMA/CEMA), PEI 未処理 + biotin N-hydroxysuccinimide ester 処理

No. 3 : P(MMA/CEMA), PEI 未処理

図 28. アミノ基導入 P(MMA/CEMA)基板の評価 (ビオチン-ストレプトアビジン結合の形成)

## 5-4. Lab-on-a-CD 上でのマウスイムノグロブリン G のサンドイッチ ELISA の構築

### 5-4-1. 実験方法

アミン導入 P(MMA/CEMA)基板に 1 次抗体を固定化した反応槽を有する 3 次元 Lab-on-a-CD を用いて、高分子機能性タンパク質であるマウスイムノグロブリン G の免疫測定法を構築し、その検出感度を検討した。PEI 処理によりアミン導入した P(MMA/CEMA)にて形成した 3 次元流路は、平面流路 (PDMS 製) と接合し、3 次元流路ネットワークを構成させた。

ディスク上に設けた複数の試薬蓄積槽より、biotin N-hydroxy-succinimide ester, ストレプトアビジン溶液、ビオチン標識 1 次抗体溶液、各  $5\mu\text{l}$  をディスクの回転による遠心力を用いて反応槽に順次送液し、1 次抗体を固定化させた。試薬の残留防止や非特異的反応の抑制のため、各反応工程の間に反応槽の洗浄工程 ( $10\mu\text{l}$ ) を設けた。さらに、1 次抗体固定化ののち、1 % ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin : BSA) 溶液 ( $10\mu\text{l}$ ) を試薬蓄積槽より送液し、非特異的反応抑制のためのブロッキング操作を行った。以上の工程により、1 次抗体を固定化した Lab-on-a-CD 上にてマウスイムノグロブリン G のサンドイッチ ELISA を行った。測定対象物質であるマウスイムノグロブリン G ( $3\mu\text{l}$ )、酵素標識 2 次抗体である HRP 標識抗マウス IgG 抗体 ( $3\mu\text{l}$ )、HRP 発色基質 (TMBZ) 溶液 ( $10\mu\text{l}$ )、および、反応停止液 (1N 硫酸:) ( $3\mu\text{l}$ ) をディスク上の複数の試薬蓄積槽より順次、反応槽に送液した。試薬類の逐次送液と反応槽内での静置の工程を経て、反応槽における免疫反応生成物 (HRP 基質より遊離した発色団) 量を HR4000 高分解能小型光ファイバースペクトロメータにより測定した (波長  $450\text{nm}$ )。なお、各反応工程間において必要となる洗浄操作についてもオンチップにて実施した。

### 5-4-2. 結果および考察

3 次元 Lab-on-a CD 上でのマウスイムノグロブリン G のサンドイッチ免疫測定の結果を図 29 に示した。免疫反応が成立している状態では、測定対象物質であるマウスイムノグロブリン G 量の増加に比例して免疫反応生成物量が増え、吸光度は増大する。図 29 に示すように、用量-反応性曲線はマウスイムノグロブリン G 量に比例して増加することが確認され、 $1\text{ng/mL}$  のマウスイムノグロブリン G を検出可能であることが示された。測定対象物質の液量が  $3\mu\text{l}$

の極微量であることから、官能基導入基板とビオチン-ストレプトアビジン膜による 1 次抗体固定化累積層を用いた Lab-on-a-CD にて 3 fg/assay ( $3 \times 10^{-12}$  g/assay) のマウスイムノグロブリン G を検出できる事が示された。以上の結果、正確さや再現性などの測定精度に係る検討が今後の課題ではあるものの、Lab-on-a-CD における高感度免疫測定法の構築の可能性を示すことに成功した。

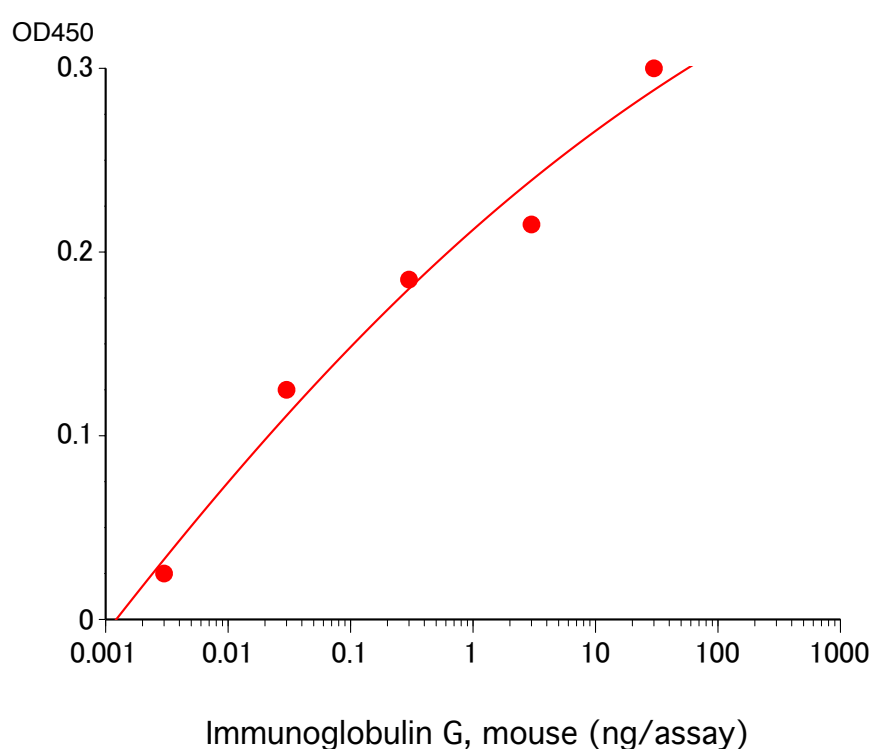


図 29. Lab-on-a-CD 上でのマウスイムノグロブリン G のサンドイッチ ELISA の検討



## 第6章 総括

第1章から第5章までで得られた主要な知見をまとめ、本論文の総括とした。

本論文は、安全安心なカボチャ生産を目指し、間接競合酵素免疫測定法 (ic-ELISA) を利用した実用的な作付け前土壌残留ヘプタクロル類診断法の構築検討を行うとともに、Lab-on-a-CD への免疫測定法の応用について述べたものである。

第2章では、土壌中ヘプタクロル類分析技術のうち、測定法構築構築に必要な試薬類や材料の作製について記述した。ヘプタクロル類並びに、混在が予想されるディルドリンの3種類の化合物に対して特異的かつ高親和性の抗体誘導を導くため、3種類の1,2,3,4,7,7-hexachloronorbornene 誘導体 (ハプテン) の設計を行い、N-hydroxysuccinimide 活性エステル法により、ハプテン分子をキャリアタンパク質に導入した免疫原3種類、スクリーニング用抗原9種類を調製した。3種類の免疫原を用いてマウス *in vivo* 免疫法、および、PEG 法による細胞と限界希釈法によるクローニング操作によって、ディルドリン、ヘプタクロル、HEPX に対し高い反応性と特徴ある親和性を有するモノクローナル抗体産生株を樹立した。作製したモノクローナル抗体のうち、ディルドリンに高い親和性を有する DrA-04 抗体、ヘプタクロルに高親和性の DrB-03 抗体、および、ディルドリン・ヘプタクロル・HEPX にほぼ同等の反応性を示す DrC-02 抗体の3種類のモノクローナル抗体を選択し、ic-ELISA の構築を行った。

さらに、特異性の異なる2種類のモノクローナル抗体 (DrA-04 抗体、DrC-02 抗体) の ic-ELISA 値より、ディルドリンおよびヘプタクロル類混在下に機器分析と同じく、各々の農薬の存在量を算出可能な方法を構築し、農薬の複合汚染下における汚染の質の解析方法を提案した。本報は単一の測定値しか得られず、複数の類似物質の共存下での解析が困難である免疫測定法の弱点を解決しうる有効な分析手法である。

第3章は免疫測定法に適した土壌試料前処理法の検討について述べ、グラファイトカーボンと新規ハイブリッド材料である E-HyCu<sup>®</sup> の2種類の担体を利用したマトリクス固相分散 (matrix solid phase dispersion : MSPD) 法による土壌試料前処理法の構築について記述した。

50% (v/v) メタノール-水により調製された土壌抽出液中のヘプタクロル類は、グラファイトカーボン担体に吸着し、アセトニトリルにより損失なく溶

出可能であることを見出し、グラファイトカーボン担体上でヘプタクロル類を簡便に濃縮できることを明らかにした。

グラファイトカーボン担体は土壤抽出液中の ic-ELISA に対する負の妨害影響の除去効果を有するが、ic-ELISA に対する妨害影響の除去が不十分であることが確認されたため、細孔を有し比表面積と粒子径を制御した活性炭にケイ素酸化物を被覆し、アミノ基含有ケイ素化合物を化学修飾したハイブリッド材料である E-HyCu<sup>®</sup>担体と組み合わせたグラファイトカーボン／E-HyCu<sup>®</sup> の 2 種類の担体を利用した MSPD 法について検討した。この結果、本法が迅速簡便、かつ、ic-ELISA に対する妨害影響の除去に優れた有効な前処理法であることを明らかにした。

第 4 章は、圃場より採取した土壤試料 60 検体について、MSPD 法による土壤試料前処理法と ic-ELISA (DrC-02 抗体使用) により土壤残留ヘプタクロル類を分析し、機器分析 (GC-MS) による分析値との比較検討した結果について述べた。GC-MS 分析により検出下限値以下であった 34 検体は ic-ELISA においても検出下限値以下であり、ic-ELISA による偽陽性は認められなかった。分析値が得られた 26 検体については、ic-ELISA 値と GC-MS 値との間に良好な相関 ( $R^2=0.966$ ) を示し、かつ、GC-MS 値と近似した値を得たことから、構築した土壤抽出液前処理法の有効性が確認された。

以上の結果から、本研究で構築した迅速簡便かつ多検体分析に適した MSPD 法による土壤試料前処理法 (第 3 章) とディルドリン、ヘプタクロル類を認識する新規なモノクローナル抗体による ic-ELISA (第 2 章) による土壤残留ヘプタクロル類分析法は実用的で有効な分析方法であることが明らかになった。

なお、本研究で構築した MSPD 法による土壤抽出液前処理法と、ヘプタクロル類測定用 ic-ELISA の組み合わせによる土壤残留ヘプタクロル類分析法は、土壤残留ヘプタクロルのかぼちゃ作付け前土壤診断ガイドライン [www.hro.or.jp/list/agricultural/center/pdf/heptachlor.pdf](http://www.hro.or.jp/list/agricultural/center/pdf/heptachlor.pdf) (地方独立行政法人北海道立総合研究機構中央農業試験場 農業環境部環境保全グループ) として採用されており、本研究における大きな成果である。

第 5 章は Lab-on-a-CD への免疫測定の実用化について記述した。

Lab-on-a-CD では免疫反応場が微小化されることから、反応の効率化が期待される一方、検出感度の低減が課題として挙げられる。特に、環境試料等の

分析では微量分析が求められることから、微小化に伴う検出感度の低減を防ぐ方法として、抗原認識能の低下を抑制しつつ抗体分子を Lab-on-a-CD の反応場に集積化を試みた。内海研にて、塩素基導入ポリマー P(MMA/CEMA) を合成し X 線リソグラフィーによる微細構造体加工を行った P(MMA/CEMA)基板を作製し、P(MMA/CEMA)基板にポリエチレンイミン処理を行い、基板上に高反応性のアミノ基を導入した基板を作製した。この基板上に導入されたアミノ基を利用してビオチン・ストレプトアビジン結合による累積膜を形成し、ビオチン標識抗体をビオチン・ストレプトアビジンの累積膜上に結合させ 1 次抗体累積膜とした。1 次抗体累積膜を利用したサンドイッチ ELISA により Lab-on-a-CD 上でマウスイムノグロブリン G を測定した結果、0.003～30 ng/assay の微量な範囲で用量依存的な反応性が観察され、Lab-on-a-CD における高感度免疫測定法の構築の可能性を示すことに成功した。これにより、Lab-on-a-CD における免疫測定法の実用化に向けてのデータ蓄積の道が示された。

## 参考文献

- 1) Stockholm Convention. Format adopted by the 1<sup>st</sup> meeting of the Conference of the Parties in decision SC-1/23  
(<http://www.pops.int/documents/registers/specexempt.htm>), accessed 2018,3,2.
- 2) 経済産業省, POPs 条約  
([http://www.meti.go.jp/policy/chemical\\_management/int/pops.html](http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/int/pops.html)) ,  
accessed 2018,3,2.
- 3) WHO (World Health Organization). International Programme on Chemical Safety (IPCS). A review of selected persistent organic pollutants: DDT, Aldrin, Dieldrin, Endrin, Chlordane, Hexachlorobenzene, Mirex, Toxaphene, Polychlorinated biphenyls, Dioxins and Furans, PCS/95.39, 1995.
- 4) Jorgenson, JL.; Aldrin and dieldrin: a review of research on their production, environmental deposition and fate, bioaccumulation, toxicology, and epidemiology in the United States. *Environ. Health Perspect.* 2001, 109, 113–139.
- 5) 環境省環境リスク評価室. 「化学物質の環境リスク評価第 1 巻, [4] アルドリン」, 2002. (<https://www.env.go.jp/chemi/report/h14-05/chap01/03/04.pdf>),  
accessed 2018,3,2.
- 6) 環境省環境リスク評価室. 「化学物質の環境リスク評価第 1 巻, [21] ディルドリン」, 2002. (<https://www.env.go.jp/chemi/report/h14-05/chap01/03/21.pdf>),  
accessed 2018,3,2.
- 7) 環境省環境リスク評価室. 「化学物質の環境リスク評価第 1 巻, [34] ヘプタクロル」, 2002. (<https://www.env.go.jp/chemi/report/h14-05/chap01/03/34.pdf>),  
accessed 2018,3,2.

- 8) Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries of Japan. *Nouyaku Youran (A Handbook of Pesticides)*; Nihon Shokubutu-Boeki kyokai; Japan Plant Protection Association: Tokyo, Japan, 1958–2000.
- 9) Meijer, SN.; Halsall, CJ.; Harner, T.; Peters, AJ.; Ockenden, WA.; Johnston, AE.; Jones, KC.; Organochlorine pesticide residues in archived UK soils. *Environ. Sci. Technol.* 2001, 35 1989–1995.
- 10) Hashimoto, Y.; Dieldrin residue in the soil and cucumber from agricultural field in Tokyo, *J. Pestic. Sci.* 2005, 30, 397–402.
- 11) Hayashi, O.; Kameshiro, M.; Satoh, K.; Degradation of the persistent organic pollutant [<sup>14</sup>C] heptachlor in Japanese field soils. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 2013, 77, 1240–1244.
- 12) Barrie, LA.; Gregor, D.; Hargrave, B.; Lake, R.; Muir, D.; Shearer, R.; Tracey, B.; Bidleman, T.; Arctic contaminants: sources, occurrence and pathways. *Sci. Total Environ.* 1992, 122, 1–74.
- 13) Bildeman, TF.; Jantunen, LMM.; Wiberg, K.; Harner, T.; Brice, KA.; Su, K.; Falconer, RL.; Leone, AD.; Aigner, EJ.; Parkhurst, WJ.; Soil as a Source of Atmospheric Heptachlor Epoxide. *Environ. Sci. Technol.* 1998, 32, 1546–1548.
- 14) Otake, Y.; Sato, T.; Dieldrin Absorption into Several Crops. *Bull. Hokkaido Central Agric. Exp. Stn.* 1998, 75, 21–24 (in Japanese).
- 15) Kondo, H.; Amakawa, E.; Sato, H.; Tasuda, K.; Onuki, K.; Akiba, M.; Kanaya, K.; Survey of pesticide residues in agricultural products cultivated in Tama region, Tokyo. *Annual Rep. Tokyo Metropolitan Inst. Public Health.* 2003, 54, 132–135.
- 16) Saito, T.; Otani, T.; Seike, N.; Okazaki, M.; A comparison of dieldrin residues in various vegetable crops cultivated in a contaminated field. *Soil Science Plant Nutr.* 2012, 58, 373–383.

- 17) Murano, H.; Otani, T.; Makino, T.; Seike, N.; Sakai, M.; Effects of application of carbonaceous adsorbents on pumpkin (*Cucurbita maxima*) uptake of heptachlor epoxide in soil. *Soil Science Plant Nutr.* 2009, 55, 325–332.
- 18) Stanciu, G.; Dobrinas, S.; Birghila, S.; Popescu, M.; Determination of organic compounds from different types of coffee by HPLC and GC-ECD analysis. *Environ. Eng. Manag. J.* 2008, 7, 661–666.
- 19) Sichilongo, K.; Banda D.; GC-MS determination of targeted pesticides in environmental samples from the Kafue Flats of Zambia. *Bull Environ. Contam. Toxicol.* 2013, 5, 510–516.
- 20) McManus, SL.; Coxon, CE.; Richards, KG.; Danaher, M.; Quantitative solid phase microextraction - gas chromatography mass spectrometry analysis of the pesticides lindane, heptachlor and two heptachlor transformation products in groundwater. *J. Chromatogr. A.* 2013, 1284, 1–7.
- 21) FDA (U.S. Food and Drug Administration). *Pesticide Analytical Manual*, 3rd ed.; U.S. Food and Drug Administration: Washington, DC, 1994; Vol. I, Chapter 3.
- 22) Mukherjee, I.; Gopal, M. Chromatographic techniques in the analysis of organochlorine pesticide residues. *J. Chromatogr.* 1996, 754, 33–42.
- 23) Hammock, BD.; Gee, SJ.; Harrison, RO.; Jung, F.; Goodrow, MH.; Li, QX.; Lucas, AD.; Szekacs, A.; Sundaram, KMS.; Immunochemical Methods for Environmental Analysis: addressing critical problems. In: *Immunochemical Methods for Environmental Analysis*, Van Emon, JM.; Mumma, R., editors.; 1990, 112–139, ACS Symposium Series 442, American Chemical Society, Washington.
- 24) El-Gendy, KS.; Aly, NM.; Mosallam, EM.; Salama, AK.; Preparation of antibodies and development of an enzyme immunoassay for determination of atrazine in environmental samples. *J. Environ. Sci. Health B.* 2011, 46, 321–327.

- 25) Hongsibsong, S.; Wipasa, J.; Pattarawarapan, M.; Chantara, S.; Stuetz, W.; Nosten, F.; Prapamontol, T.; Development and Application of an Indirect Competitive Enzyme-Linked Immunosorbent Assay for the Detection of p, p'-DDE in Human Milk and Comparison of the Results against GCECD. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 16–22.
- 26) Okazaki, F.; Hirakawa, Y.; Yamaguchi-Murakami, Y.; Harada, A.; Watanabe, E.; Iasa, S.; Narita, H.; Miyake, S.; Development of Direct Competitive ELISA for Residue Analysis of Fungicide Chlorothalonil in Vegetables, *Food Hyg. Saf. Sci.* 2014, 55, 65-72.
- 27) 清家伸康; 元木裕; 大谷卓; 上野達; 中本洋; 岡本真理; 山田哲平; 齋藤隆; 成田伊都美; 佐藤賢一; 山崎晴民; 遠藤昌伸; 橋本良子; ”研究成果 521 集, 生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発 [化学物質 (第 1 編)] ”, 農林水産技術会議事務局, 2014, 144-150.
- 28) 大沢利昭監訳, 生化学実験法 10, モノクローナル抗体, 198, 第 1 版, 第 2 刷, 東京化学同人
- 29) Köhler, G.; Milstein, C.; Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature* 1975, 256, 495-497.
- 30) Langone, J. J.; Van Vunakis, H. Radioimmunoassay for dieldrin and aldrin. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.* 1975, 10, 163-171.
- 31) Esser, T.; Karu, A. E.; Toia, R. F.; Casida, J. E. Recognition of tetramethylenedisulfotetramine and related sulfamides by the GABA-gated chloride channel and a cyclodiene-sensitive monoclonal antibody. *Chem. Res. Toxicol.* 1991, 4, 162-167.
- 32) Lee, N.; Skerrett, J.; McAdam, D. P. Hapten synthesis and development of ELISAs for detection of endosulfan in water and soil. *J. Agric. Food Chem.* 1995, 43, 1730-1739.

- 33) Wigfield, Y. Y.; Grant, R. Evaluation of an immunoassay kit for the detection of certain organochlorine (cyclodiene) pesticideresidues in apple, tomato, and lettuce. *Bull. EnViron. Contam. Toxicol.* 1992, 49, 342-347.
- 34) Abad, A.; Manclu's, J. J.; Mojarrad, F.; Mercader, J. V.; Miranda, M. A.; Primo, J.; Guardiola, V.; Montoya, A. Hapten synthesis and production of monoclonal antibodies to DDT and related compounds. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 3694-3702.
- 35) Pattarawarapan, M.; Chantara, S.; Stuetz, W.; Nosten, F.; Prapamontol, T.; Development and application of an indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of p, p'-DDE in human milk and comparison of the results against GC-ECD. *J. Agric. Food Chem.* 2012, 60, 16-22.
- 36) Manclús, J. J.; Abad, A.; Lebedev, M. Y.; Mojarrad, F.; Micková, B.; Mercader, J. V.; Primo, J.; Miranda, MA.; Montoya, A; Development of a monoclonal immunoassay selective for chlorinated cyclodiene insecticides. *J. Agric. Food Chem.* 2004, 52, 2776–2784.
- 37) Stanker, L.H.; Monoclonal antibodies to cyclodienes indextecides and method for detecting the same, U.S. Patent 5,334,528, 1994-08-02.
- 38) Glass TR.; Ohmura, N.; Saikia, H.; Sawadaishi, K.; Kataoka, C.; Takagi, Y.; Ohiwa, T.; Development and characterization of new monoclonal antibodies specific for coplanar polychlorinated biphenyls. *Anal. Chim. Acta.* 2004, 517, 161–168.
- 39) Practical Handbook of Biochemistry and Molecular Biology, Fasman, D.G. ed., CRC Press: Boston, 1992.
- 40) ISO 11843-5: 2008 Capability of detection -- Part 5: Methodology in the linear and non-linear calibration cases.



- 41) Sakai, M.; Seike, N.; Murano, H.; Otani, T.; Relationship between Dieldrin Uptake in Cucumber and Solvent-Extractable Residue in Soil. *J. Agric. Food Chem.* 2009, 57, 11261–11266.
- 42) Zhang, Q.; Zhang, W.; Wang, X.; Li, P.; Immunoassay development for the class-specific assay for types I and II pyrethroid insecticides in water samples, *Molecules* 2010, 15, 164-177.
- 43) H. Feng, X. Tong, W. Li, L. Zhou, L. Shi, Q. Cai: Indirect competitive enzyme-linked immunosorbent assay of tris-(2,3-dibromopropyl) isocyanurate with monoclonal antibody, *Talanta* 2014, 128, 434-444.
- 44) J. Masiri, L. Benoit, M. Meshgi, J. Day, C. Nadala, M. Samadpour: A Novel Immunoassay Test System for Detection of Modified Allergen Residues Present in Almond-, Cashew-, Coconut-, Hazelnut-, and Soy-Based Nondairy Beverages, *J. Food Prot.* 2016, 79, 1572-1582.
- 45) Kataoka, C.; Nihei, M.; Nimata, M.; Sawadaishi, K.; Development of a Model Immunoassay Utilizing Monoclonal Antibodies of Different Specificities for Quantitative Determination of Dieldrin and Heptachlors in Their Mixtures, *J. Agric. Food Chem.* 2016, 64, 8950-8957.
- 46) Fujita, H.; Hamada, N.; Sawadaishi, K.; Honda, K.; DEVELOPMENT of a sample oreoaretion system foe dioxins: application to immunoassay, *Organohalogen Compounds* 2004, 66, 677-681.
- 47) 鐘迫典久；環境バイオモニタリングの実際-免疫化学測定法を中心として-環境技術, 2006, 35, 639- 643.
- 48) 澤田石一之; 片岡千和; 上田裕子; 本田克久; “研究成果 521 集, 生産・流通・加工工程における体系的な危害要因の特性解明とリスク低減技術の開発 [化学物質 (第 1 編)] ”, 農林水産技術会議事務局, 2014, 232-235.

- 49) Sugitate, K.; Saka, M.; Decrease in the matrix enhancement effect on pesticides analysis with GC-MS using new types of solid-phase extraction column, *J. Pestic. Sci.* 2015, 40, 87-9.
- 50) García-Valcárcel, A. I.; Molero, E.; Tadeo, J. L.; Hernando, M. D.; Determination of selected environmental contaminants in foraging honeybees, *Talanta* 2016, 148, 1-6.
- 51) 農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業，安全・安心なかぼちゃ生産に向けた土壌残留ヘプタクロル類診断技術の開発, 2014-2016 年度.
- 52) 宮本信一；中本貴騎士；大西悠太；有菌幸司；疫化学測定法と各種環境試料前処理法，免疫化学測定法研究会第 10 回学術シンポジウム講演要旨集, 2005, 20-22.
- 53) 日本特許，公開特許公報，シーズテック；食品に残留する農薬等の測定のための抽出精製剤及びその製造法、並びに測定妨害物質の除去方法，日本特許公開公報，2016-030219 . 2016-03-07.
- 54) 上田佑子；本田克久；食品中残留農薬分析における多成分妨害物質の除去を目的としたハイブリッド型充填剤の開発，農薬残留分析研究会講演要旨集第 36 回, 2013, 165-172.
- 55) Madou, M.; Zoval, J.; Jia, G.; Kido, H.; Kim, J.; Kim, N.; Lab on a CD, *Annu Rev Biomed Eng.* 2006, 8, 601-28.
- 56) Haeberle, S.; Zengerle, R; Microfluidic platforms for lab-on-a-chip applications, *Lab. Chip.* 2007, 7, 1094-110.
- 57) Kong, L.X.; Perebikovdy, A.; Moebius, J.; Kulinsky, I.; Madou, M.; Lab-on-a-CD: A Fully Integrated Molecular Diagnostic System, *J. Lab. Autom.* 2016, 21, 325-355.
- 58) 高山喜好；Lab on a chip 技術の創薬研究への応用；日本薬理学雑誌，2008, 131, 28-31.

- 59) Lin, S; Fischl, A. S.; Bi, X.; Parce, W.; Separation of phospholipids in microfluidic chip device: application to high-throughput screening assays for lipid-modifying enzymes, *Anal. Biochem.* 2003, 314, 97-107.
- 60) Walsh, D.I., 3rd; Murthy, S.K.; Russom, A.; Ultra-High-Throughput Sample Preparation System for Lymphocyte Immunophenotyping Point-of-Care Diagnostics, *J. Lab. Autom.* 2016, 21, 706-712.
- 61) Huh, D.; Matthews, B. D.; Mammoto, A.; Montoya-Zavala, M.; Hsin, H. Y.; Ingber, D. E.; Reconstituting organ-level lung functions on a chip, *Science* 328, 2010, 1662–1668.
- 62) 木村啓志；藤井輝雄；界康行；創薬を加速化するツールとしての Organ-on-a-chip の進展，*薬剤学*，2016, 76, 238-242.
- 63) Kikutani, Y.; Horiuchi, T.; Uchiyama, K.; Hisamoto, H.; Tokeshi, M.; Kitamori, T; Glass Microchip with Three-Dimensional Microchannel Network for 2×2 Parallel Synthesis, *Lab Chip* 2001, 2, 188-192.
- 64) 内海裕一；浮田芳昭；“放射光 LIGA プロセスを用いた 3 次元マイクロ化学システムの開発”，*ケミカルエンジニアリング* 2007, 52, 32-38.
- 65) Ukita, Y.; Asano, T.; Fujiwara, K.; Yokoyama, T.; Matsui, K.; Takeo, M.; Negoro, S.; Saiki, T.; Utsumi, Y.; Novel Characteristics of Multifunctional Fluid Filters Fabricated High-Energy Synchrotron Radiation Lithography, *Jpn. J. Appl. Phys.* 2006, 45, 7203-7208.
- 66) Utsumi, Y.; Asano, T.; Ukita, Y.; Matsui, K.; Takeo, M; Negoro, S.; High sensitive immunoassay for endocrine disrupting chemicals using antibody immobilized microcapillary bundle structure, *Microsyst. Technol.* 2008, 14, 1399-1403.

- 67) Ukita, Y.; Kondo, S.; Kataoka, C.; Takeo, M.; Negoro, S.; Utsumi, Y.; Immunoassay using poly-tetrafluoroethylene microstructure in organic solvent, *Microsyst. Technol.* 2010, 16, 1465-1470.
- 68) Sato, K.; Anzai, J.; Development of functional surfaces by layered thin films containing proteins”, BUNSEKI KAGAKU, 2007, 56, 387-395. (*in Japanese*)
- 69) Guesdon, J. L.; Ternynck, T.; Avrameas, S.; The use of avijin-biotin interaction in immunoenzymatic techniques, *J. Histochem. Cytochemistry* 1979, 27, 1131-1139
- 70) Hsu, S. M.; Raine, L.; Fanger, H.; Use of avijin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures, *J. Histochem. Cytochemistry* 1981, 29, 577-580
- 71) Baojiao, G.; Wang, X.; Shen, Y.; Studies on characters of immobilizing penicillin G acylase on a novel composite support PEI/SiO<sub>2</sub>”, *Biochem. Eng. J.* 2006, 28, 140-147.

## 謝辞

終わりに臨み，本研究に際して終始ご懇篤なる御指導，御鞭撻を賜りました兵庫県立大学 高度産業科学技術研究所 内海裕一教授に心から感謝の意を表します。本論文の副査としてご指導いただきました兵庫県立大学，根来誠司教授，住友弘二教授，荒木望准教授，山口明啓准教授に深く感謝致します。

また，第 5 章の研究を遂行するにあたり，修飾 CD 基板等の材料を提供いただいた兵庫県立大学大学院工学研究科博士前期課程を修了された畔田吏氏に，御礼申し上げます。

さらに，本研究の遂行において終始実験に協力をいただいた合同会社カーバングル・バイオサイエンテック エグゼクティブ 澤田石一之博士，二瓶真澄嬢に心より感謝致します。

本研究の一部は「農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業，安全・安心なかぼちゃ生産に向けた土壌残留ヘプタクロル類診断技術の開 （26074C）」の支援によりなされたことを付記し，ここに謝意を表します。

## 研究業績

### < 学術論文 >

1. Kataoka, C.; Nihei, M.; Nimata, M.; Sawadaishi, K.; Development of a Model Immunoassay Utilizing Monoclonal Antibodies of Different Specificities for Quantitative Determination of Dieldrin and Heptachlors in their Mixtures” , *J.Agric. Food Chem.*, 64 (46), 8950-8957, 2016.
2. 片岡千和; 二瓶真澄; 二又正臣; 澤田石一之; 本田克久; 酵素免疫測定報を用いた土壌残留ヘプタクロル類の作付け前分析のための土壌試料調製法の構築, *分析化学*, 66 (10), 719-726, 2017.
3. 片岡千和; 畔田吏; 澤田石一之; 浮田芳昭; 山口啓明; 内海裕一; 3 次元 Lab-on-a-CD 免疫センシングにおける高感度化, *電気化学会論文誌 C (電子・情報・システム部門誌)* , 2017, 137(3), 418-423.

### < 国内学会および国際会議 >

1. 澤田石一之; 二瓶真澄; 鳥淵泉; 片岡千和; “ウリ科野菜生産のための土壌残留ドリリン系農薬迅速検出用 ELISA システムの開発”, 第 33 回農薬環境科学研究会・第 38 回農薬残留分析研究科合同シンポジウム, 2015, 199-205.
2. Sawadaishi, K.; Kataoka, C.; Ueda, Y.; Honda, K.; Development of Soil Evaluation Method for POPs Contamination in Cucurbits - ELISA and Sample Preparation Method - , Abstract of International Conference of Asian Environmental Chemistry 2014, ICAEC2014, 300.